(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 044609 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.14

(21) Номер заявки
201892296

(22) Дата подачи заявки
2017.04.14

(51) Int. Cl. ***A61K 48/00*** (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) ДОСТАВКА БЕТА-САРКОГЛИКАНА И МИКРОРНК-29 ВЕКТОРОМ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА И ЛЕЧЕНИЕ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

(31) **62/323,333; 62/433,548**
(32) **2016.04.15; 2016.12.13**
(33) **US**
(43) **2019.04.30**
(86) **PCT/US2017/027583**
(87) **WO 2017/180976 2017.10.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РИСЕРЧ ИНСТИТЬЮТ ЭТ НЭШНУАЙД ЧИЛДРЕН'С ХОСПИТАЛ (US)

(72) Изобретатель:
Родино-Клапак Луиза, Менделл Джерри Р. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) POZSGAI et al. "P-Sarcoglycan Gene Transfer Leads to Functional Improvement in a Model of LGMD2E (S61.002)," Neurology, 08 April 2014 (08.04.2014), Vol. 82, No. 10, Suppl. S61.002, Pg. 1 of 1. entire document
US-A-5672694
US-A1-20110301226
US-A1-20060154250
POZSGAI et al. "172. Pre-Clinical Efficacy Study of Beta-Sarcoglycan Gene Transfer," Molecular Therapy, 01 May 2013 (01.05.2013), Vol. 21, Suppl. 1, Pg. S68. entire document

(57) В данном документе описаны рекомбинантные AAV векторы, содержащие полинуклеотидную последовательность, содержащую β-саркогликан, и способы применения указанных рекомбинантных векторов для уменьшения или предотвращения фиброза у субъекта-млекопитающего, страдающего от мышечной дистрофии. Также в данном документе описаны комбинированные терапии, включающие в себя введение AAV вектора(ов), экспрессирующего(их) β-саркогликан и miR-29c субъекту-млекопитающему, страдающему мышечной дистрофией.

044609 B1

044609 B1

Данное изобретение заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/323333, поданной 15 апреля 2016 года, и предварительной заявке США № 62/433548, поданной 13 декабря 2016 года, которые обе включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Включение посредством ссылки материалов, поданных в электронном виде

Данная заявка содержит в качестве отдельной части раскрытия перечень последовательностей в машиночитаемой форме, который полностью включен в данное описание посредством ссылки и определен как: имя файла - 50622A_SeqListing.txt; размер - 21466 байт; созданный - 13 апреля 2017 года.

Область изобретения

В данном документе описаны терапевтические векторы, такие как AAV (аденоассоциированный вирус) векторы, экспрессирующие β-саркогликан, и способы применения данных векторов для уменьшения и предотвращения фиброза у субъектов, страдающих мышечной дистрофией. Согласно данному изобретению также предложены способы комбинированной генной терапии, включающие введение первого AAV вектора, экспрессирующего β-саркогликан, и второго AAV вектора, экспрессирующего miR-29, для уменьшения и предотвращения фиброза у пациентов, страдающих мышечной дистрофией.

Уровень техники

Мышечная дистрофия лимба-пояса (LGMD, limb-girdle muscular dystrophy) типа 2E (LGMD2E) представляет собой аутосомно-рецессивное нарушение, вызванное мутациями в гене, кодирующем β-саркогликан (SGCB), вызывающими потерю функционального белка (1). LGMD2E представляет собой относительно распространенную и тяжелую форму LGMD в Соединенных Штатах, с общемировой частотой встречаемости 1/200000-1/350000 (2). Отсутствие β-саркогликана приводит к прогрессирующей дистрофии с хронической потерей мышечных волокон, воспалением, заменой жиром и фиброзом, что приводит к ухудшению мышечной силы и функции (3, 4). В виде комплекса саркогликаны (α-, β, γ-, δ-), вариирующие в размере от 35 до 50 кДа (5), все представляют собой трансмембранные белки, которые обеспечивают стабильность сарколеммы, предоставляя защиту от механического стресса во время мышечной активности (3). Потеря β-саркогликана в LGMD2E обычно приводит к различной степени сопутствующей потери других саркогликановых белков, делая мышечную мембрану непрочной, что приводит к потере мышечных волокон (1). Хотя диапазон времени проявления клинического фенотипа LGMD2E вариирует, диагноз обычно ставят до 10 лет, а потеря способности к перемещению происходит в промежуток со среднего до позднего подросткового возраста (1, 6, 7). Пациенты имеют повышенную сывороточную креатинкиназу (СК), слабость проксимальных мышц, трудности при вставании с пола и прогрессирующую потерю способности передвигатся. В пятидесяти процентах случаев встречаются проблемы с сердцем.

Аденоассоциированный вирус (AAV) является парвовирусом с дефектной репликацией, одноцепочечным ДНК-геном, длинна которого составляет около 4, 7 т.п.н., включая два 145 нуклеотидных инвертированные концевые повторы (ITR). Существует несколько серотипов AAV. Нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV являются известными. В качестве других примеров полный геном AAV-1 предоставлен под номером доступа ГенБанка NC_002077; полный геном AAV-2 предоставлен под номером доступа ГенБанка NC_001401 и Srivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983); полный геном AAV-3 предоставлен под номером доступа ГенБанка NC_1829; геном AAV-4 предоставлен под номером доступа ГенБанка NC 001829; геном AAV-5 преоставлен под номером доступа ГенБанка AF085716; геном AAV-6 преоставлен под номером доступа ГенБанка NC_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 предоставлены под номерами доступа ГенБанка AX753246 и AX753249 соответственно; геном AAV-9 предоставлен в Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 предоставлен в Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 предоставлен в Virology, 330(2): 375-383 (2004). Последовательность генома AAV rh.74 представлена в патенте США № 9434928, включенном в данный документ посредством ссылки. Цис-действующие последовательности, направляющие репликацию, инкапсулирование/упаковку и интеграцию в хромосомы клетки-хозяина вирусной ДНК (rep), содержатся в ITR (инвертированные концевые повторы) AAV. Три промотора AAV (обозначенные p5, p19 и p40 по их относительному расположению на геномной карте) управляют экспрессией двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены rep и cap. Два промотора rep (p5 и p19) в комбинации с дифференциальным сплайсингом одиночного интрона AAV (при нуклеотидах 2107 и 2227) приводят к получению четырех белков рецепта (rep 78, rep 68, rep 52 и rep 40) из гена rep. Белки Rep обладают несколькими ферментативными свойствами, которые в конечном счете отвечают за репликацию вирусного генома. Ген cap экспрессируется из промотора p4 0 и кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативные сайты сплайсинга и неконсенсусные старт-кодоны трансляции отвечают за продуцирование трех родственных капсидных белков. Единственный консенсусный сайт полиаденилирования находится в позиции 95 карты генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассмотрены в Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992).

AAV обладает уникальными особенностями, которые делают его привлекательным в качестве вектора доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфицирование клеток AAV в культуре является нецитопатическим, а естественное инфицирование людей и других животных является

скрытым и бессимптомным. Кроме того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что позволяет применять различные типы тканей in vivo. Кроме того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и не делящиеся клетки, и может по существу сохраняться в виде транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомный элемент) в течение жизни данных клеток. Геном провируса AAV вставляют в клонированную ДНК в плазмиды, что делает возможным создание рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, направленные на репликацию и инкапсулирование генома AAV, содержатся в ITR генома AAV, некоторые или все внутренние приблизительно 4,3 т.н. генома (кодирующие репликацию и структурные капсидные белки, rep-cap) могут быть заменены на чужеродную ДНК. Для создания векторов на основе AAV белки rep и cap могут быть представлены в транс. Еще одна важная особенность AAV заключается в том, что он является чрезвычайно стабильным и крепким вирусом. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56° до 65°C в течение нескольких часов), что делает холодовое хранение AAV менее критичным. AAV даже может быть лиофилизирован. Наконец, AAV-инфицированные клетки не устойчивы к суперинфекции.

Многочисленные исследования продемонстрировали долгосрочную (больше чем 1,5 года) опосредованную рекомбинантным AAV экспрессию белка в мышцах. См., Clark et al., Hum Gene Ther, 8: 659-669 (1997); Kessler et al., Proc Nat. Acad Sc. USA, 93: 14082-14087 (1996); and Xiao et al., J Virol, 70: 8098-8108 (1996). См. также, Chao et al., Mol Ther, 2:619-623 (2000) and Chao et al., Mol Ther, 4:217-222 (2001). Более того, поскольку мышца сильно васкуляризирована, трансдукция рекомбинантным AAV приводит к появлению трансгенных продуктов в кровеносной системе после внутримышечной инъекции, как описано в Herzog et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 5804-5809 (1997) и Murphy et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 13921-13926 (1997). Кроме того, Lewis et al., J Virol, 76: 8769-8775 (2002) продемонстрировали, что волокна скелетных мышц обладают необходимыми клеточными факторами для правильного гликозилирования, свертывания и секреции антител, что указывает на то, что мышца способна к устойчивой экспрессии секретируемых белковых терапевтических агентов.

Визникающей формой терапии LGMD2E является доставка гена посредством вируса, для восстановления белка дикого типа в пораженной мышце, что приводит к восстановлению мышечной функции. Учитывая, что у подмножества пациентов может развиться кардиомиопатия (8, 9, 10, 13), это следует учитывать при долгосрочном уходе за данными пациентами. В предыдущих сообщениях была хорошо охарактеризована мышь Sgcb-null. Araishi et al. (3) содали мышь с недостаточностью по β-саркогликану, с сопутствующей потерей всех саркогликанов, а также саркоспана, с по меньшей мере небольшим сохранением мерозина, дистрогликанов и дистрофина, воспроизводя клиническую картину, наблюдаемую при LGMD2E. Гистологические изменения в данной животной модели были также прототипом клинического аналога, включая отчетливость фиброза скелетных мышц (14). Dressman et al. (25) инъецировали поперечную брюшную мышцу применяя rAAV2.CMV.SGCB. Экспрессия сохранялась в течение 21 месяца, а мышечные волокна были защищены от рецидивирующего некроза. Было также описано применение самокомплементарного AAV для усиления экспрессии трансгена (16), а также мышечно-специфического промотора для улучшения скелетной мышцы (20, 26), и оптимизации гена β-саркогликана человека (hSGCB).

Функциональное улучшение у пациентов, страдающих от LGMD и других мышечных дистрофий, требует как восстановления генов, так и уменьшения фиброза. Существует необходимость в способах уменьшения фиброза, которые могут быть объединены с способами восстановления генов для более эффективного лечения LGMD и других мышечных дистрофий.

Сущность изобретения

В данном документе описаны геннотерапевтические векторы, например AAV, экспрессирующие ген β-саркогликана и способы доставки β-саркогликана в мышцы для уменьшения и/или предотвращения фиброза; и/или для увеличения мышечной силы и/или для лечения β-саркогликанопатии у субъекта-млекопитающего, страдающего мышечной дистрофией.

Кроме того, согласно данному изобретению предложены комбинированные терапии, и подходы с использованием геннотерапевтических векторов, доставляющих β-саркогликан для компенсации генного дефекта, наблюдаемого при LGMD2E, и геннотерапевтические векторы, доставляющие miR-29 для последующего подавления фиброза.

В одном аспекте, в данном документе описан рекомбинантный AAV вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую β-саркогликан. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидная последовательность, кодирующая β-саркогликан, содержит последовательность, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 7 0%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и кодирует белок, который сохраняет активность β-саркогликана. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидная последовательность, кодирующая β-саркогликан, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидная последовательность, кодирующая β-саркогликан, представляет собой нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

В другом аспекте, рекомбинантный AAV вектор, описанный в данном документе, содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую β-саркогликан, который по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично по меньшей мере на 90, 91, 92, 93 или 94%, и еще более типично по меньшей мере на 95, 96%, 97, 98 или 99% по последовательности идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и белок сохраняет активность β-саркогликана.

В другом аспекте, в данном документе описан рекомбинантный AAV вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный β-саркогликан, которая содержит нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется в строгих условиях с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 или ей комплементарным.

Термин "строгий" применяется для обозначения условий, которые обычно подразумеваются в данной области техники как строгие. Строгость гибридизации в основном определяется температурой, ионной силой и концентрацией денатурирующих агентов, таких как формамид. Примеры строгих условий гибридизации и промывок представляют собой 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при 65-68°С, или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015М цитрата натрия, и 50% формамида при температуре 42°С. См. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Могут также быть использованы более строгие условия (такие как более высокая температура, более низкая ионная сила, более высокая концентрация формамида, или другой денатурирующий агент) однако будет затронута скорость гибридизации. В случаях, когда речь идет о гибридизации дезоксиолигонуклеотидов, дополнительные иллюстративные условия строгой гибридизации включают в себя промывку 6× SSC 0,05% пирофосфата натрия при 37°С (для 14-основных олигонуклеотидов), 48°С (для 17-основных олигонуклеотидов), 55°С (для 20-основных олигонуклеотидов) и 60°С (для 23-основных олигонуклеотидов).

Другие агенты могут быть включены в гибридизационные и промывочные буферы с целью уменьшения неспецифической и/или фоновой гибридизации. Примеры представляют собой 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,1% поливинилпирролидона, 0,1% пирофосфата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия, NaDodS04, (SDS), фиколл, раствор Денхардта, разрушенная ультразвуком ДНК спермы лосося (или другая не комплементарная ДНК) и сульфат декстрана, хотя могут быть применены и другие подходящие агенты. Концентрация и типы этих добавок могут быть изменены без существенного влияния на строгость условий гибридизации. Эксперименты по гибридизации обычно проводят при pH 6,8-7,4, однако в типичных условиях ионной силы скорость гибридизации практически не зависит от pH. См. Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England). Специалистами в данной области техники могут быть скорректированы условия гибридизации, чтобы приспособить эти переменные и позволить ДНК с различной степенью родственности последовательности формировать гибриды.

В другом аспекте, рекомбинантные AAV векторы, описанные в данном документе, могут быть функционально связаны с регуляторным элементом, специфичным для мышц. Например, регуляторный элемент, специфичный для скелетных мышц, представляет собой человеческий элемент гена актина скелетных мышц, элемент гена актина сердца, миоцит-специфичный связывающий энхансер фактор MEF, мышечную креатинкиназу (MKK), tMKK (усеченную MKK), тяжелую цепь миозина (MHC), MHCK7 (гибридная версия MHC и MCK), C5-12 (синтетический промотор), энхансерный элемент мышиной креатинкиназы, элемент гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемент гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

В некоторых вариантах осуществления, специфичный для мышц промотор является MHCK7 (SEQ ID NO: 4). Иллюстративный rAAV, описанный в данном документе, представляет собой pAAV.MHCK7.hSCGB, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3; причем промотор MCHK7 охватывает нуклеотиды 130-921, химерный интрон SV40 охватывает нуклеотиды 931-1078, последовательность β-саркогликана охватывает нуклеотиды 1091-2047, а последовательность поли-А охватывает нуклеотиды 2054-2106.

В некоторых вариантах осуществления, специфичный для мышц промотор представляет собой tMCK (SEQ ID NO: 6). Иллюстративный rAAV, описанный в данном документе, представляет собой pAAV.tMCK.hSCGB, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5; причем промотор tMCK охватывает нуклеотиды 141-854, химерный интрон SV40 охватывает нуклеотиды 886-1018, последовательность β-саркогликана охватывает нуклеотиды 1058-2014, а последовательность поли-А охватывает нуклеотиды 2021-2073.

AAV может иметь любой серотип, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 и AAV rh.74. Получение псевдотипированного rAAV описано, например, в WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с мутациями капсида. См., например, Marsic et al., Molecular Therapy, 22 (11): 1900-1909 (2014).

Также расматриваются композиции, содержащие любой из rAAV векторов, описанных в данном документе.

Также предлагаются способы получения рекомбинантной AAV векторной частицы, включающие культивирование клетки, которая была трансфицирована любым рекомбинантным AAV вектором, описанным в данном документе, и выделение рекомбинантных AAV частиц из супернатанта трансфицированных клеток. Также рассматриваются вирусные частицы, содержащие любой из рекомбинантных AAV векторов, описанных в данном документе.

Также предлагаются способы уменьшения фиброза у нуждающегося в нем субъекта-млекопитающего. В этом отношении способ включает введение терапевтически эффективного количества описанного в данном документе AAV вектора (или композиции, содержащей AAV вектор, описанный в данном документе) субъекту-млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления, субъект-млекопитающее страдает от мышечной дистрофии. В некоторых вариантах осуществления, введение AAV вектора, описанного в данном документе (или композиции, содержащей AAV вектор, описанной в данном документе), уменьшает фиброз в скелетной мышце или в сердечной мышце субъекта. Данные способы могут дополнительно включать стадию введения второго рекомбинантного AAV вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, содержащую miR29C.

Термин "мышечная дистрофия", как используется в данном документе, относится к нарушению, при котором сила и объем мышц постепенно снижаются. Неограничивающие примеры болезней мышечной дистрофии могут включать в себя: мышечную дистрофию Беккера, дистрофию большеберцовой мышцы, мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфюсса, плече-лопаточно-лицевую миопатию, саркогликанопатию, врожденную мышечную дистрофию, такую как врожденная мышечная дистрофия из-за частичной недостаточности LAMA2, врожденная мышечная дистрофия из-за недостаточности мерозина, врожденная мышечная дистрофия типа 1D, врожденная мышечная дистрофия Фукуямы, мышечная дистрофия лимба-пояса 1A, мышечная дистрофия лимба-пояса 2A, мышечная дистрофия лимба-пояса 2B, мышечная дистрофия лимба-пояса 2C, мышечная дистрофия лимба-пояса 2D, мышечная дистрофия лимба-пояса 2E, мышечная дистрофия лимба-пояса 2F, мышечная дистрофия лимба-пояса 2G, мышечная дистрофия лимба-пояса 2H, мышечная дистрофия лимба-пояса 2I, мышечная дистрофия лимба-пояса 2I, мышечная дистрофия лимба-пояса 2J, мышечная дистрофия лимба-пояса 2K, синдром ригидного позвоночника с простым буллезным эпидермолизом, окулофарингеальная мышечная дистрофия, врожденная мышечная дистрофия Ульриха, и склероатоническая мышечная дистрофия Ульриха. В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает от мышечной дистрофии лимба-пояса. В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает от мышечной дистрофии лимба-пояса 2E (LGMD2E).

Термин "фиброз", как применяется в данном документе, относится к избыточному или нерегулируемому отложению компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), и аномальным процессам восстановления в тканях после повреждения, включая скелетные мышцы, сердечную мышцу, печень, легкие, почки и поджелудочную железу. Компоненты ВКМ, которые отлаживаются, включают в себя коллаген 1, коллаген 2 или коллаген 3, и фибронектин.

В другом аспекте, в данном документе описан способ увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта-млекопитающего, включающий в себя введение терапевтически эффективного количества описанного в данном документе AAV вектора (или композиции, содержащей AAV вектор, описанный в данном документе) субъекту-млекопитающему.

В любом из способов согласно данному изобретению субъект может страдать от мышечной дистрофии, такой как мышечная дистрофия лимба-пояса или любой другой дистрофии, связанной с дистрофином.

Также предложен способ лечения мышечной дистрофии у субъекта-млекопитающего, включающий в себя введение терапевтически эффективного количества описанного в данном документе AAV вектора (или композиции, содержащей AAV вектор, описанный в данном документе) субъекту-млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления, мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию лимба-пояса. Любой из описанных в данном документе способов может дополнительно включать в себя стадию введения второго рекомбинантного AAV вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, содержащую miR29C.

Также рассматривается комбинированная терапия. В этом отношении любой из вышеперечисленных способов, описанных в данном документе, может дополнительно включать в себя введение второго рекомбинантного AAV вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, содержащую miR29C. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий miR29C, функционально связан с регуляторным элементом, специфичным для мышц. Например, регуляторный элемент, специфичный для мышц, представляет собой человеческий элемент гена актина скелетных мышц, элемент гена актина сердца, миоцит-специфичный связывающий энхансер фактор MEF, мышечную креатинкиназу (MKK), tMKK (усеченную MKK), тяжелую цепь миозина (MHC), MHCK7 (гибридная версия MHC и MCK), C5-12 (синтетический промотор), энхансерный элемент мышиной креатинкиназы, элемент гена тропонина C быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемент гена тропонина C медленно

сокращающихся мышечных волокон сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE). В некоторых вариантах осуществления, второй рекомбинантный вектор содержит полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 8, как описано в предварительной заявке США № 62/323163 (раскрытие которой включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме).

В способах комбинированной терапии, описанных в данном документе, в которых как rAAV вектор, экспрессирующий β-саркогликан, так и rAAV вектор, экспрессирующий miR29c, вводят субъекту-млекопитающему, причем rAAV векторы могут быть введены одновременно или введены последовательно, при этом rAAV вектор, экспрессирующий β-саркогликан вводят непосредственно перед или после rAAV, экспрессирующего miR29c. Альтернативно, AAV вектор, экспрессирующий β-саркогликан, вводят в течение около 1-24 ч (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 ч) после введения rAAV, экспрессирующего miR-29, или реализуют способы согласно данному изобретению, в которых AAV вектор, экспрессирующий β-саркогликан, вводится в течение около 1-24 ч (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 ч) перед введением rAAV, экспрессирующего miR-29. В некоторых вариантах осуществления, AAV вектор, экспрессирующий β-саркогликан, вводят в течение около 1-5 ч (например, 1, 2, 3, 4 или 5 ч) после введения rAAV, экспрессирующего miR-29, или реализуют способы согласно данному изобретению в которых AAV вектор, экспрессирующий β-саркогликан, вводят в течение около 1-5 ч (например, 1, 2, 3, 4 или 5 ч) перед введением rAAV, экспрессирующего miR-29c.

В любом из способов согласно данному изобретению rAAV вектор вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, в любом из способов согласно данному изобретению rAAV вводят системно, например вводят парентерально с помощью инъекции, инфузии или имплантации.

Композиции согласно данному изобретению составлены для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, композиции согласно данному изобретению составлены для системного введения, такого как парентеральное введение путем инъекций, инфузии или имплантации.

Кроме того, любая композиция составлена для введения субъекту, страдающему от мышечной дистрофии (такой как мышечная дистрофия лимба-пояса или любой другой дистрофии, связанной с дистрофином). В некоторых вариантах осуществления, композиция может дополнительно содержать второй рекомбинантный AAV вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 8.

В любом из применений согласно изобретению лекарственное средство составлено для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, в любом из применений согласно изобретению лекарственное средство составлено для системного введения, такого как парентеральное введение путем инъекций, инфузии или имплантации. Кроме того, любое лекарственное средство может быть приготовлено для введения субъекту, страдающему от мышечной дистрофии (такой как мышечная дистрофия лимба-пояса, или любой другой мышечной дистрофией, связанной с дистрофином). В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство может дополнительно содержать второй рекомбинантный AAV вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 8.

Вышеупомянутые параграфы не предназначены для определения каждого аспекта изобретения, и дополнительные аспекты описаны в других разделах, таких как Подробное описание сущности изобретения. Подразумевается, что весь документ должен быть связан как цельное раскрытие, и следует понимать, что рассматриваются все сочетания признаков, описанных в данном документе, даже если комбинация признаков не найдена вместе в одном предложении, или параграфе, или разделе данного документа. Изобретение включает в себя, в качестве дополнительного аспекта, все варианты осуществления изобретения, более узкие по своему объему, чем варианты, определенные в конкретных параграфах выше. Например, существуют определенные аспекты изобретения, которые описываются как род, и тогда следует понимать, что каждый член рода является отдельно аспектом изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1D изображено, что опосредованная AAV экспрессия β-саркогликана восстанавливает дистрофин-ассоциированные белки и поддерживает целостность мембраны. (а) Самокомплементарный AAV вектор, содержащий кодон-оптимизированный ген β-саркогликана человека (hSGCB), под управлением промотора специфической для мышц yMKK. Кассета также содержит химерный интрон для усиления процессинга и сигнал полиаденилирования для стабильности. (б) Иммунофлуоресцентное окрашивание анти-β-SG-антителом демонстрирует высокие уровни окрашивания трансгена SGCB сарколеммы у 5-недельных мышей через 6 и 12 недель после инъекции. Показаны ×20 изображения. Процент волокон, экспрессирующих бета-саркогликан для каждой TA мышцы, составлял в среднем 88,4±4,2% через 6 недель (n=9, 4 самца, 5 самок) и 76,5±5,8% через 12 недель (n=6, 4 самца, 2 самки). Экспрессию белка проверяли вестерн-блоттингом с окрашиванием гамма-тубулина в качестве контроля загрузки, (с) Доставка

AAV β-саркогликана приводит к восстановлению других членов саркогликанвого комплекса; а-саркогликан, дистрофии. ×20 изображения. (d) scAAVrh.74.hSGCB защищает мембраны $sgcb^{-/-}$ от повреждений. Сопоставляли изображение, показывающее большую площадь окрашенных эванс голубым волокон (красная), с кластером β-саркогликан-положительных волокон, которые были защищены от окрашивания эванс голубым. Показаны ×40 изображения.

На фиг. 2A-2D изображен гистологический анализ скелетной мышцы с недостаточностью β-SG. Обработка scAAVrh.74.hSGCB нормализует гистологические параметры мышей $sgcb^{-/-}$. Окрашивание гематоксилином и эозином, и окрашивание пикросириус красным проводили на TA мышцах из $sgcb^{-/-}$ мышей вместе с обычными контрольными мышами C57/BL6, и мышами, обработанными scAAVrh.74.hSGCB, с последующим количественным определением гистологических параметров и % окрашивания коллагена. (a) Окрашивание гематоксилином и эозином показывает наличие центрально-нуклеированных волокон, воспалительных клеток и большой разброс диаметра волокон в мышце с недостаточностью β-SG, и улучшение гистопатологии после переноса гена. (b) Окрашивание пикросириус красным показывает уменьшение окрашивания в красный коллагена в обработанной мышце. (c) Количественная оценка центрально-нуклеированных волокон, показывающая уменьшение после обработки ($P<0,0005$, односторонний дисперсионный анализ) и (d) представление распределения размера волокон и увеличение среднего размера волокна TA мышцы из контрольных мышей C57/BL6 и мышей $sgcb^{-/-}$ по сравнению с обработанными мышами ($P<0,0001$, односторонний дисперсионный анализ). (e) Количественное определение % коллагена в TA мышцах из контрольных мышей C57/BL6 и мышей $sgcb^{-/-}$ по сравнению с обработанными мышами $sgcb^{-/-}$($P<0,0001$, односторонний дисперсионный анализ). 100 мкм полоска-шкала показана для ×20 изображений. ***$P<0,001$; ****$P<0,0001$.

На фиг. 3A-3C изображено, что внутримышечная доставка scAAVrh.74.hSGCB корректирует тетаническую силу и устойчивость к повреждению, вызванному сокращением. Собирали TA мышцы мышей $sgcb^{-/-}$, обработанных 3×10^{10} гв (геномов вектора) scAAVrh.74.hSGCB с помощью IM (внутримышечной) инъекции через 6 недель после переноса гена, и применяли методику для оценки тетанической силы, и применяли методику эксцентричного сокращения для оценки устойчивость к травмам, вызванным сокращением. (a) Обработанные AAVrh.74.hSGCB TA мышцы продемонстрировали значительное улучшение как абсолютной тетанической силы ($P<0,01$, парный t-критерий), (b) нормализованной удельной силы ($P<0,05$, парный t-критерий), что не отличалось от силы дикого типа (C57/BL6). (c) обработанные AAVrh.74.hSGCB TA мышцы продемонстрировали значительное улучшение устойчивости к травме, вызванной сокращением, по сравнению с необработанными контрольными $sgcb^{-/-}$ ($P<0,01$, двухсторонний дисперсионный анализ). Показано сохранение силы после 10 сокращений. *$P<0,05$; **$P<0,01$.

На фиг. 4A-4C изображены результаты анализа старых мышей, обработанных внутримышечно scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. (a) Иммунофлуоресцентное окрашивание TA мышцы из 6-месячных обработанных мышей $sgcb^{-/-}$ через 12 недель после инъекции (n=5, 5 самцов) показывает сарколемную экспрессию трансгена SGCB в количествах, составляющих в среднем 80% у инъекцированных мышей по сравнению с необработанными (n=4, 4 самца). (b) Окрашивание пикросириус красным обработанной и необработанной TA мышцы, (c) Количественное определение коллагена, представленное в окрашенной пикросириус красным ткани, показывает значительное снижение количества коллагена после обработки с помощью rAAVrh.74.tMCK.hSGCB ($P<0,0001$, односторонний дисперсионный анализ). 100 мкм полоска-шкала показана для ×20 изображений. ****$P<0,0001$.

На фиг. 5A-5C изображены результаты доставки scAAVrh.74.hSGCB через сосуды. Четырехнедельные (n=5, 5 самцов) и пятинедельные (n=4, 2 самца, 2 самки) мыши с недостаточностью β-SG были обработаны вектором через бедренную артерию, чтобы доставить вектор в мышцы нижней конечности. При дозе 5×10^{11} гв экспрессия β-SG составляла 90,6±2,8% в TA мышце и 91,8±4,7% в икроножной мышце обработанных мышей, что сопровождалось улучшением гистопатологии, приводя к значительному улучшению удельной силы по сравнению с необработанными животными даже следуя модели травматизма. (a) экспрессия белков (β-SG у трех репрезентативных мышей. Мышца из необработанной мыши (β-SG KO показана для сравнения в вставке (внизу справа). Показаны ×20 изображения. Экспрессия в обработанных мышцах, подтвержденная вестерн-блоттингом, и показан гамма-тубулин в качестве контроля загрузки. (b) Гистопатология значительно улучшается после обработки высокой дозой. Верхние панели - обработанные TA и икроножные мышцы. Нижние панели - необработанные недостаточные по β-SG контрольные мышцы. 100 мкм полоска-шкала показана для × 20 изображений, (c) Процент удельной силы, сохраненной в мышце ДРП (длинный разгибатель пальцев), после 10 циклов повреждения, вызванного эксцентрическим сокращением. Обработка 5×10^{11} гв AAVrh.74.hSGCB привела к значительному улучшению в силе, которая эквивалентна контрольной мышцы ДТ (нормальной)($P<0,05$, односторонний дисперсионный анализ). *$P<0,05$.

На фиг. 6A, 6B изображено снижение фиброза у обработанных ILP (изолированная перфузия конечностей) мышей β-SG KO. (a) Окрашивание пикросириус красным показывает снижение фиброза у обработанных мышей, что указывает на уменьшение отложения коллагена по сравнению с необработанными мышами $sgcb^{-/-}$. (b) Количественное определение коллагена в TA и икроножных мышцах из BL6

ДТ, необработанных мышей sgcb$^{-/-}$ и обработанных мышей подтверждает снижение количества коллагена у обработанных мышей (P<0,001, односторонний дисперсионный анализ). 100 мкм полоска-шкала показана для ×20 изображений. ***P<0,001.

На фиг. 7A и 7B изображено векторное биораспределение и экспрессия белка. (a) Гистограмма среднего распределения вектора в тканях, собранных у обработанных ILP мышей, приведенное в копиях транскрипта на микрограмм ДНК, добавленного в qPCR. Обрабатывали левую конечность. (b) С помощью вестерн-блоттинга не наблюдается экспрессии белка в органах не мишенях.

На фиг. 8A-D изображена гистологическая и функциональая недостаточность у мышей sgcb$^{-/-}$ в 7-месячном возрасте. Трехкрасочное окрашивание в диафрагме (A) и сердце (C) мышей SGCB$^{-/-}$ демонстрирует обширный фиброз (красный). Сила, производимая диафрагмой, значительно уменьшается в диафрагме (B), и также уменьшается фракция сердечного выброса у мышей sgcb$^{-/-}$ (D).

На фиг. 9 представлена схема терапевтической трансгенной кассеты с β-саркогликаном. Самокомплементарный AAV вектор, содержащий кодон-оптимизированный ген β-саркогликана человека (hSGCB). Экспрессией управляет специфичный для мышц промотор MHCK7. Кассета также содержит химерный интрон для усиления процессинга и сигнал полиаденилирования для стабильности.

На фиг. 10 изображено иммунофлуоресцентное окрашивание β-саркогликана в различных скелетных мышцах, которое демонстрирует устойчивую экспрессию с редкими отрицательными волокнами после 1, 4 или 6 месяцев лечения (показано 1 месяц).

На фиг. 11 изображено иммунофлуоресцентное окрашивание β-саркогликана в диафрагме и серце, которое демонстрирует устойчивую экспрессию с редкими отрицательными волокнами после 1, 4 или 6 месяцев лечения (показано 1 месяц).

На фиг. 12A-D изображено восстановление экспрессии SGCB после внутривенной доставки scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (a) Кассета scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (b) Иммунофлюоресцентная визуализация через 6 месяцев после инъекции скелетных мышц, диафрагмы и сердца у мышей sgcb-/-, инъецированных внутривенно общей дозой le12 гв scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. Репрезентативные изображения скелетных мышц, показывающие в среднем 98,13±0,31% трансдукции. Показаны 20× изображения. Репрезентативные изображения сердечной ткани, демонстрирующие высокие уровни экспрессии трансгена hSGCB. Показаны 10× изображения. (в) Вестерн-блоттинг всех мышц из одной обработанной мыши sgcb$^{-/-}$подтверждающий экспрессию трансгена hSGCB. (d) Вестерн-блоттинг на экспрессию hSGCB в сердцах пяти обработанных мышей sgcb$^{-/-}$ с количественной оценкой плотности, показывающий сверхэкспрессию hSGCB вплоть до 72,0% уровней BL6 ДТ.

На фиг. 13A-D изображен эффект системного лечения с помощью scAAVrh74.MHCK7.hSGCB на мышечную патологию. (a) Гематоксилиновое и эозиновое окрашивание диафрагмы и мышцы QUAD мышей C57BL/6 ДТ, sgcb$^{-/-}$ и обработанных scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, показывающее нормализованную гистопатологию. (б) Количественная оценка уменьшения центрально нуклеированных волокон в мышцах у обработанных sgcb$^{-/-}$ по сравнению с необработанными sgcb$^{-/-}$ (TA, GAS, GLUT, диафрагма, p<0,0001) (QUAD, PSOAS, TRI, p<0,05). (c) Нормализация распределения волокон в GAS, PSOAS и TRI, и (d) увеличение среднего размера волокна в обработанных мышцах по сравнению с необработанными мышцами sgcb$^{-/-}$ (p<0,001) (односторонний дисперсионный анализ) (n=5 на группу).

На фиг. 14A и 14B изображено уменьшение отложения коллагена у внутривенно обработанных мышей (β-SG KO. (a) Окрашивание пикросириус красным показало снижение фиброза у обработанных мышей, как показано уменьшением отложения коллагена в диафрагме и GAS по сравнению с необработанными мышами sgcb$^{-/-}$. (b) Количественное определение уровней коллагена в мышцах диафрагмы и GAS у мышей C57BL/6 ДТ (n=4), необработанных мышей sgcb$^{-/-}$ (n=4), и обработанных мышей sgcb$^{-/-}$ (n=5) подтверждает снижение уровней коллагена в обеих обработанных мышцах (p <0,0001, односторонний дисперсионный анализ). Полоска масштаба 100 мкм показана для изображений 20×.

На фиг. 15 изображено, что доставка scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB через хвостовую вену мышам sgcb$^{-/-}$полностью восстанавливает силу в диафрагме после 6 месяцев лечения (введение IV (1e12гв)). Мышечные полосы диафрагмы собирали у обработанных и контрольных мышей SGCB$^{-/-}$ и мышей ДТ, и подвергали измерениям силы; лечение восстанавливало силу до уровней ДТ.

На фиг. 16 показана схема rAAV вектора scAACrh.74.CMV.miR29c и нуклеотидная последовательность miR-29c в природном каркасе miR-30.

На фиг. 17 изображено, что после 3 месяцев лечения с помощью AAVrh.74.CMV.miR29C мышцы TA собирали у обработанных и контрольных мышей SGCB$^{-/-}$ и мышей ДТ, и анализировали на фиброз (количества коллагена) (n=5 в группе). Используя окрашивание сириус красным и количественную оценку, наблюдали снижение количеств коллагена после лечения (см. фиг. 18). Результаты показали, что количества транскриптов Col1A, Col3A и Fbn нормализировались, а размер мышечных волокон увеличился.

На фиг. 18 изображены репрезентативные изображения отсканированных полных срезов необработанных и обработанных с помощью AAVrh.74.CMV.miR29C передних большеберцовых мышц, окрашенных сириус красным, который окрашивает коллаген 1 и 3. Количественная оценка изображена на

фиг. 17.

На фиг. 19A и 19B изображена коррекция кифосколиза в грудном отделе позвоночника, (a) Кифосколиоз у мышей $sgcb^{-/-}$ как обнаружено рентгенографией. (b) Бал кифотического индекса (KI) мышей $sgcb^{-/-}$ (3,69) является низким по сравнению с C57BL/6 ДТ (6,01) ($p<0,01$), но увеличивается после лечения scAAVrh.74 .MHCK7.hSGCB (5,39) ($p<0,05$ по сравнению с $sgcb^{-/-}$) (односторонний дисперсионный анализ) (n=6 в группе).

На фиг. 20A-D изображена оценка кардиомиопатии в сердечной мышце. (a) Покраска гематоксилином-эозином и пикросириус красным сердец 7-месячных BL6 ДТ, $sgcb^{-/-}$ и обработанных AAV.MHCK7.hSGCB $sgcb^{-/-}$ через 6 месяцев после лечения показывает дистрофию миокарда в необработанных мышцах $ssgcb^{-/-}$ и улучшение после лечение. (b) ЯМР анализ сердца, показывающий уменьшение ударного объема сердец $sgcb^{-/-}$ ($p<0,01$), минутного объема сердца и фракции выброса ($p<0,05$) (односторонний дисперсионный анализ), и улучшение через 6 месяцев после лечения (n=6 на группу). (c) Вестерн-блоттинг двух сердец C57BL/6 ДТ, двух сердец $sgcb^{-/-}$ и пяти обработанных с помощью AAV.MHCK7.hSGCB сердец $sgcb^{-/-}$, показывающий снижение количества сердечного тропонина I у больных мышей. (d) Денситометрическая количественная оценка, показывающая снижение сердечного тропонина I (cTrpI) до 60,38% по сравнению с количествами у BL6 ДТ, и сверхэкспрессия вплоть до 135,8% по сравнению с количествами BL6 ДТ.

На фиг. 21A-B изображены исправление функции диафрагмы и увеличенная активность в клетке с открытым пространством. (a) Мышечные полоски диафрагмы собирали для измерения силы и сопротивления усталости у мышей BL6 ДТ (n=5), мышей $sgcb^{-/-}$ (n=4) и обработанных AAV.MHCK7. hSGCB $sgcb^{-/-}$ (n=5), все в возрасте 7 месяцев. Шесть месяцев лечения восстановили силу до уровней ДТ ($p<0,01$ по сравнению с $sgcb^{-/-}$) и улучшили устойчивость к усталости. (b) Общая способность к передвижению в плоскостях x и y значительно снижается у мышей $sgcb^{-/-}$ ($p<0,0001$) и немного улучшена у мышей, обработанных MCHK7 ($p<0,05$). Вертикальная активность, в виде передвижения на задних конечностях, также снижалась у мышей $sgcb^{-/-}$ ($p<0,01$) и значительно увеличивалась у мышей, обработанных MCHK7 ($p<0,05$) (односторонний дисперсионный анализ) (n=6 в группе).

На фиг. 22A, B изображен анализ биораспределения и анализа экспрессии трансгена вне мишени системной доставки scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (a) Гистограмма распределения среднего количества копий гв транскрипта на микрограмм ДНК, добавленной в реакцию кПЦР в различных тканях из двух мышей $sgcb^{-/-}$ после IV (внутривенной) доставки scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB при общей дозе 1e12 гв. (b) Биораспределение согласно вестерн-блоттингу в мышцах и органах из мышей $sgcb^{-/-}$, систематически инъецированных scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, указывает на отсутствие экспрессии трансгена hSGCB в любых не-мышечных образцах.

Подробное описание сущности изобретения

Данное изобретение основано на обнаружении того, что введение AAV вектора, содержащего полинуклеотид, экспрессирующий β-саркогликан, приводит к уменьшению или полному обращению вспять мышечного фиброза в животной мышиной модели мышечной дистрофии лимба-пояса. Как показано в Примерах, введение AAV вектора, описанного в данном документе, приводило к обращению вспять признаков дистрофии, включающих в себя меньшее количество редуцированных волокон, уменьшенное воспаление и улучшение функционального восстановления путем защиты от эксцентрического сокращения с увеличенным производством силы.

Как применяется в данном документе, термин "AAV" является стандартной аббревиатурой для аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус представляет собой одноцепочечный ДНК парвовирус, который размножается только в клетках, в которых определенные функции обеспечиваются ко-инфицирующим вспомогательным вирусом. В настоящее время существует тринадцать серотипов AAV, которые были охарактеризованы. Общую информацию и обзоры по AAV можно найти, например, в Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169-228, и Berns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York). Однако нет сомнений, что эти же принципы будут применимы к дополнительным серотипам AAV, поскольку хорошо известно, что различные серотипы довольно тесно связаны как структурно, так и функционально даже на генетическом уровне. (См., например, Blacklowe, 1988, pp. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; и Rose, Comprehensive Virology 3:1-61 (1974)). Например, все серотипы AAV, по-видимому, обладают очень сходными свойствами репликации, опосредованными гомологичными генами rep; и все они имеют три родственных капсидных белка, таких как те, которые экспрессируются в AAV2. Степень родства дополнительно предсказывается с помощью гетеродуплексного анализа, который показывает обширную кросс-гибридизацию между серотипами по всей длине генома; и наличие аналогичных самоотжигающихся сегментов на концах, которые соответствуют "последовательностям инвертированного концевого повтора" (ITR). Подобные закономерности инфекционности также предполагают, что функции репликации в каждом серотипе находятся под одинаковым регуляторным контролем.

"Вектор AAV", как применяется в данном документе, относится к вектору, содержащему один или большее количество представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевого повтора AAV (ITR). Такие векторы AAV могут быть реплицирова-

ны и упакованы в инфекционные вирусные частицы, когда они присутствуют в клетке-хозяине, которая была трансфицирована вектором, кодирующим и экспрессирующим продукты генов rep и cap.

"Вирион AAV" или "вирусная частица AAV" или "векторная частица AAV" относится к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсидированного полинуклеотидного вектора AAV. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (то есть полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), его обычно называют "векторная частица AAV" или просто "AAV вектор". Таким образом, продуцирование векторной частицы AAV обязательно включает в себя получения вектора AAV, поскольку такой вектор содержится в векторной частице AAV. AAV

Рекомбинантные геномы AAV согласно данному изобретению содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, и один или большее количество ITR AAV, фланкирующих молекулу нуклеиновой кислоты. ДНК AAV в геномах rAAV может быть из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, включая, но не ограничиваясь лишь этими серотипами AAV: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 и AAV rh.74. Получение псевдотипированного rAAV описано, например, в WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с мутациями капсида. См., например, Marsic et al., Molecular Therapy, 22 (11): 1900-1909 (2014). Как отмечено в разделе "Уровень техники" выше, нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV известны в данной области техники. Для способствования специфической для скелетных мышц экспрессии могут применяться AAV1, AAV5, AAV6, AAV8 или AAV9.

ДНК-плазмиды согласно данному изобретению содержат геномы rAAV. ДНК-плазмиды переносят в клетки, пригодные для инфицирования вспомогательным для AAV вирусом (например, аденовирусом, аденовирусом с удаленным E1, или вирусом герпеса) для упаковки генома rAAV в инфекционные вирусные частицы. Методы получения частиц rAAV, в которых в клетку вводят геном AAV, который должен быть упакован, гены rep и cap, и вспомогательные вирусные функции, являются стандартными в данной области техники. Получение rAAV требует, чтобы в одной клетке (обозначенная в данном документе как упаковывающая клетка) присутствовали следующие компоненты: геном rAAV, отделенные от (т.е. не в) генома rAAV rep и cap гены AAV, и функции вспомогательного вируса. Гены rep и cap AAV могут быть из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут быть из серотипа AAV, который отличается от серотипа ITR генома rAAV, включая, но не ограничиваясь лишь этими серотипами AAV: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 и AAV rh.74. Получение псевдотипированного rAAV описано, например, в WO 01/83692, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Способ получения упаковывающей клетки заключается в создании клеточной линии, которая стабильно экспрессирует все необходимые компоненты для продуцирования частиц AAV. Например, плазмида (или несколько плазмид), содержащая геном rAAV без генов rep и cap AAV, гены rep и cap AAV, отделенные от генома rAAV, и маркер селекции, такой как ген устойчивости к неомицину, интегрированы в геном клетки. Геномы AAV были введены в бактериальные плазмиды с помощью таких процедур, как приделывание GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. S6. USA, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления эндонуклеазами рестрикции (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) или прямым лигированием тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). Упаковывающая клеточная линия затем заражается вспомогательным вирусом, таким как аденовирус. Преимущества этого метода заключаются в том, что клетки можно отбирать, и они подходят для крупномасштабного производства rAAV. Другие примеры подходящих способов задействуют аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, для введения геномов rAAV и/или генов rep и cap в упаковывающие клетки.

Общие принципы получения rAAV рассмотрены, например, Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; и Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Различные подходы описаны в Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988); и Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828); патенте США № 5173414; WO 95/13365 и соответствующем патенте США № 5658776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) Vaccine 13:1244-1250; Paul et al. (1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy 3:1124-1132; патенте США № 5786211; патенте США № 5871982; и патенте США № 6258595. Вышеупомянутые документы тем самым включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме, с уделением особого внимания тем разделам документов, которые касаются получения rAAV.

Таким образом, согласно изобретению предложены упаковывающие клетки, которые продуцируют инфекционный rAAV. В одном варианте осуществления, упаковывающие клетки могут быть стабильно трансформированными раковыми клетками, такими как клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (родственная линия 293). В другом варианте осуществления, упаковывающие клетки представляют собой клет-

ки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, такими как клетки небольшого числа пассажей 293 (клетки почки плода человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты плода человека), клетки WI-38 (фибробласты плода человека), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого плода макака резус).

Рекомбинантные AAV (то есть инфекционные инкапсулированные частицы rAAV) согласно данному изобретению содержат геном rAAV. Варианты осуществления включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: rAAV обозначенный как pAAV.MHCK7.hSCGB, который содержит полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3; и pAAV.tMCK.hSCGB, который содержит полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

rAAV может быть очищен стандартными способами данной области техники, такими как колоночная хроматография или градиенты хлорида цезия. Способы очистки векторов rAAV от хелперного вируса известны в данной области техники и включают в себя способы, описанные, например, в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002); патенте США № 6566118 WO 98/09657.

В другом варианте осуществления, в изобретении рассматриваются композиции, содержащие rAAV согласно данному изобретению. Композиции, описанные в данном документе, включают в себя rAAV в фармацевтически приемлемом носителе. Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и адъюванты. Приемлемые носители, разбавители и адъюванты являются нетоксичными для реципиентов и предпочтительно являются инертными в используемых дозах и концентрациях и включают в себя: буферы, такие как фосфатный, цитратный, или на основе других органических кислот; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; полипептиды с низкой молекулярной массой; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, плюроники или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Титры rAAV, которые будут вводить в способах согласно данному изобретению, будут варьировать в зависимости, например, от конкретного rAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(-ов) клеток, которые будут мишенями, и могут быть определены посредством способов данной области техники. Титры rAAV могут находиться в диапазоне или от около 1×10^{6}, около 1×10^{7}, около 1×10^{8}, около 1×10^{9}, около 1×10^{10}, около 1×10^{11}, около 1×10^{12}, около 1×10^{13} до около 1×10^{14} или больше устойчивых к ДНКазам частиц (DRP) в мл. Дозировки могут также выражаться в единицах геномов вируса (гв).

В изобретении рассматриваются способы трансдукции клетки-мишени с помощью rAAV, in vivo или in vitro. Способы in vivo включают в себя стадию введения эффективной дозы или эффективных многократных доз композиции, содержащей rAAV согласно данному изобретению, животному (включая человека), нуждающемуся в этом. Если дозу вводят до развития нарушения/заболевания, введение является профилактическим. Если доза вводится после развития нарушения/заболевания, введение является терапевтическим. В вариантах осуществления изобретения, эффективная доза представляет собой дозу, которая облегчает (устраняет или уменьшает) по меньшей мере один симптом, связанный с состоянием нарушения/заболевания, которое лечат, что замедляет или предотвращает прогрессирование до состояния нарушения/заболевания, которое замедляет или предотвращает прогрессирование состояния нарушения/заболевания, которое уменьшает степень болезни, что приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или продлевает выживание. Мышечная дистрофия, такая как мышечная дистрофия лимба-пояса представляет собой пример заболевания, которое рассматривается как пригодное для профилактики или лечения способами согласно данному изобретению.

В данном изобретении также рассматриваются комбинированные терапии. Комбинация, применяемая в данном документе, включает в себя как одновременное лечение, так и последовательное лечение. Специально рассматриваются комбинации способов согласно данному изобретению со стандартными лекарственными терапиями (например, кортикостероидами), как и комбинации с новыми терапиями.

Терапевтически эффективное количество rAAV вектора представляет собой дозу rAAV в диапазоне от около 1e13 до около 5e14 гв/кг, или от около 1e13 до около 2e13 гв/кг, или от около 1e13 до около 3e13 гв/кг, или от около 1e13 до около 4e13 гв/кг, или от около 1e13 до около 5e13 гв/кг, или от около 1e13 до около 6e13 гв/кг, или от около 1e13 до около 7e13 гв/кг, или от около 1e13 до около 8e13 гв/кг, или от около 1e13 до около 9e13 гв/кг, или от около 1e13 до около 1e14 гв/кг, или от около 1e13 до около 2e14 гв/кг, или от 1e13 до около 3e14 гв/кг, или от около 1e13 до около 4e14 гв/кг, или от около 3e13 до около 4e13 гв/кг, или от около 3e13 до около 5e13 гв/кг, или от около 3e13 до около 6e13 гв/кг, или от около 3e13 до около 7e13 гв/кг, или от около 3e13 до около 8e13 гв/кг, или от около 3e13 до около 9e13 гв/кг, или от около 3e13 до около 1e14 гв/кг, или от около 3e13 до около 2e14 гв/кг, или от 3e13 гв/кг до около 3e14 гв/кг, или от около 3e13 до около 4e14 гв/кг, или от около 3e13 до около 5e14 гв/кг, или от около 5e13 до около 6e13 гв/кг, или от около 5e13 до около 7e13 гв/кг, или от около 5e13 до около 8e13

гв/кг, или от около 5e13 до около 9e13 гв/кг, или от около 5e13 до около 1e14 гв/кг, или от около 5e13 до около 2e14 гв/кг, или от 5e13 до около 3e14 гв/кг, или от около 5e13 до около 4e14 гв/кг, или от около 5e13 до около 5e14 гв/кг, или от около 1e14 до около 2e14 гв/кг, или от 1e14 до около 3e14 гв/кг, или от около 1e14 до около 4e14 гв/кг, или от около 1e14 до около 5e14 гв/кг. Изобретение также включает в себя композиции, содержащие данные диапазоны rAAV вектора.

Например, терапевтически эффективное количество rAAV вектора представляет собой дозу 1e13, около 2e13, около 3e13, около 4e13, около 5e13, около 6e13, около 7e13, около 8e13, около 9e13, около 1e14, около 2e14, около 3e14, около 4e14 и 5e14 гв/кг. Изобретение также включает в себя композиции, содержащие данные дозы rAAV вектора.

Введение эффективной дозы композиций может осуществляться стандартным путями, котрые включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: внутримышечный, парентеральный, внутривенный, пероральный, буккальный, назальный, легочный, внутричерепной, внутрикостный, внутриглазной, ректальный или вагинальный. Путь(и) введения и серотип(ы) компонентов AAV rAAV (в частности, ITR AAV и капсидный белок) согласно данному изобретению могут быть выбраны и/или сопоставлены специалистами в данной области техники, с учетом инфекции и/или состояния болезни, которая подлежит лечению, и целевых клеток/ткани (тканей), которые должны экспрессировать β-саркогликан.

Согласно данному изобретению предложены местное применение и системное введение эффективной дозы rAAV и композиций согласно данному изобретению. Например, системное введение - это введение в систему кровообращения, чтобы повлиять на весь организм. Системное введение включает в себя энтеральное введение, такое как абсорбция через желудочно-кишечный тракт и парентеральное введение путем инъекции, инфузии или имплантации.

В частности, фактическое введение rAAV согласно данному изобретению может быть выполнено с использованием любого физического метода, который будет переносить рекомбинантный вектор rAAV в ткань-мишень животного. Введение согласно изобретению включает в себя, но не ограничивается лишь этими: инъекцию в мышцу, кровоток и/или непосредственно в печень. Было продемонстрировано, что просто ресуспендирование rAAV в фосфатно-солевом буфере является достаточным для получения переносчика, применимого для экспрессии в мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений на носители или другие компоненты, которые могут быть введены совместно с rAAV (хотя для rAAV следует обычным способом избегать композиций, которые разрушают ДНК). Капсидные белки rAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы rAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца. См., например, WO 02/053703, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде инъекционных препаратов или в виде местных составов, для доставки в мышцы трансдермальным транспортом. Ранее были разработаны многочисленные составы для внутримышечной инъекции и трансдермального транспорта, и они могут быть применены в практике изобретения. rAAV могут быть использованы с любым фармацевтически приемлемым носителем для удобства введения и обращения.

Для внутримышечной инъекции могут быть использованы растворы в адъюванте, таком как кунжутное или арахисовое масло, или водный пропиленгликоль, а также стерильные водные растворы. При желании такие водные растворы могут быть забуферены, а жидкий разбавитель сначала подвергается изотоническому воздействию солевого раствора или глюкозы. Растворы rAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислые фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсия rAAV также может быть приготовлена в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и применения данные препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. В связи с этим применяемые стерильные водные среды легко доступны для получения стандартными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

Лекарственные формы, пригодные для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии, и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной, и должна быть текучей в той степени, чтобы существовала возможность ее ввести с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси, и растительные масла. Нужную текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, и с использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и тому подобным. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия. Продленная абсорбция инъецируемых композиций может быть достигнута за счет применения агентов, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций получают путем внесения rAAV в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем внесения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления инъецируемых стерильных растворов, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и метод сублимационной сушки, которые дают порошок активного ингредиента, плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Трансдукция с помощью rAAV также может проводиться in vitro. В одном варианте осуществления, желаемые мышечные клетки-мишени удаляют из субъекта, трансдуцируются rAAV и повторно вводят субъекту. Альтернативно, могут применяться изогенные или ксеногенные мышечные клетки, поскольку данные клетки не будут вызывать неуместный иммунный ответ у субъекта.

Подходящие способы трансдукции и реинтродукции трансдуцированных клеток в субъект известны в данной области техники. В одном варианте осуществления, клетки могут быть трансдуцированы in vitro путем объединения rAAV с мышечными клетками, например, в соответствующей среде, и проведен поиск клеток, несущих ДНК интереса, с использованием обычных методов, таких как Саузерн-блоттинг и/или ПЦР, или с использованием селективных маркеров. Затем трансдуцированные клетки могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций, а композицию вводят субъекту различными способами, такими как внутримышечная, внутривенная, подкожная и внутрибрюшинная инъекция, или путем инъекции в гладкую и сердечную мышцу, используя, например, катетер.

Трансдукция клеток с помощью rAAV по изобретению приводит к устойчивой экспрессии микроРНК β-саркогликана. Таким образом, данное изобретение относится к способам введения/доставки rAAV, который экспрессирует β-саркогликан, животному, предпочтительно человеку. Данные способы включают в себя трансдуцирование тканей (включая, но не ограничиваясь лишь тканями, такими как мышцы, органами, такими как печень и мозг, и железами, такими как слюнные железы) одним или большим количеством rAAV согласно данному изобретению. Трансдукция может быть проведена с помощью генных кассет, содержащих специфичные для ткани регуляторные элементы. Например, в одном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы трансдуцирования мышечных клеток и мышечных тканей, управляемые с помощью специфических для мышц регуляторных элементов, включающих в себя, но не ограничивающихся лишь этими: те, которые получены из семейств генов актина и миозина, например, из семейства генов myoD [см. Weintraub et al., Science, 251: 761-766 (1991)], специфичный для миоцитов энхансер-связывающий фактор MEF-2 [Cserjesi and Olson, Mol Cell Biol 11: 4854-4862 (1991)], регуляторные элементы, полученные из гена актина скелетных мышц человека [Muscat et al., Mol Cell Biol, 7: 4089-4099 (1987)], гена актина серда, последовательности элементов креатинкиназы мышц [см. Johnson et al., Mol Cell Biol, 9: 3393-3399 (1989)] и энхансерный элемент мышиной креатинкиназы (mCK), регуляторные элементы, полученные из гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца и гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон: индуцируемые гипоксией ядерные факторы (Semenza et al., Proc Natl Acad Sci USA, 88: 5680-5684 (1991)), стероид-индуцибельные элементы и промоторы, включающие в себя глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) (см. Mader and White, Proc. Natl. Акад. Sci. USA 90: 5603-5607 (1993)) и другие регуляторные элементы.

Мышечная ткань является привлекательной мишенью для доставки ДНК in vivo, поскольку она не является жизненно важным органом и легко доступна. В изобретении рассматривается устойчивая экспрессия микроРНК из трансдуцированных миофибрил.

Под "мышечной клеткой" или "мышечной тканью" подразумевается клетка или группа клеток, полученных из мышц любого вида (например, скелетных мышц и гладких мышц, например, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или сердечной ткани). Такие мышечные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными, такими как миобласты, миоциты, миотубы, кардиомиоциты и кардиомиобласты.

Термин "трансдукция" применяется для обозначения введения/доставки полинуклеотида интереса (например, полинуклеотидной последовательности, кодирующей β-саркогликан) в клетку-реципиент или in vivo, или in vitro, с помощью rAAV с дефектом репликации согласно изобретению, что приводит к экспрессии β-саркогликана клеткой-реципиентом.

Таким образом, согласно данному изобретению предложены способы введения пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной дозы (или доз, вводимых, по существу, одновременно или через заданные интервалы) rAAV, который кодирует β-саркогликан.

Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, полностью включены посредством ссылки в полном объеме, как если бы каждая отдельная публикация или патент был(была) конкретно и отдельно указана для включения посредством ссылки. В случае конфликта данная заявка, включая любые определения в данном документе, будет иметь преимущество права владения.

Изобретение дополнительно описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанного в формуле изобретения.

Примеры

Материалы и способы.

Животные модели - все процедуры были одобрены Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных Научно-исследовательского института Национальной детской больницы (протокол AR12-00040). Гетерозиготные мыши B6.129-Sgcb$^{tm1Kcam/1J}$ были приобретены в Jackson Laboratory (Bar Harbor, Мен, США, штамм № 006832). Мышей sgcb$^{-/-}$ получали скрещиванием гетерозиготных мышей. Мышей КО разводили и поддерживали в качестве гомозиготных животных в стандартизованных условиях в Центре животных ресурсов в Научно-исследовательском институте Национальной детской больницы. Мышей удерживали на диете грызунов Teklad Global (еда с 3,8z5 клетчатки, 18,8% белка, 5% жира) с 12:12-часовым циклом тьма-свет. Идентификацию мышей SGCB$^{-/-}$ проводили путем генотипирования с использованием ПЦР. Все животные помещались в стандартные клетки для мышей с пищей и водой в избытке.

Конструирование гена бета-саркогликана.

Полноразмерная кДНК бета-саркогликана человека (номер доступа ГенБанка NM_0034994.3) была кодон-оптимизирована и синтезирована в GenScript Inc, Пискатауэй, Нью-Джерси, США. Оптимизация кодонов с помощью GenScript использует алгоритм, который учитывает параметры, которые включают транскрипцию, процессинг мРНК и стабильность, трансляцию и белковый фолдинг для проектирования последовательности кДНК, которая приводит к максимальной экспрессии в мышечной ткани (www.genscript.com).

Для конструкции pAAV.tMCK.hSGCB кДНК затем клонировали в плазмиду, содержащую ITA AAV2, и кассета содержала консенсусную последовательность Козак (CCACC), химерный интрон SV40 и сайт синтетического полиаденилирования (53 п. н.). Рекомбинантный промотор tMCK был любезно предоставлен доктором Сяо Сяо (Университет Северной Каролины). Он представляет собой модификацию ранее описанного промотора CK627 и содержит модификацию в энхансере выше промоторной области, содержащей сайты связывания факторов транскрипции. Энхансер состоит из двух E-боксов (правого и левого). Модификация промотора tMCK включает в себя мутацию, преобразующую левый E-box в правый E-box (модификация 2R) и вставку 6 п. н. (модификация S5). Вектор pAAV.tMCK.hSGCB был сконструирован путем лигирования фрагмента KpnI/XbaI 1040 п. н. из pUC57-BSG (Genscript Inc.) в сайты KpnI/XbaI pAAV.tMCK.hSGCA (26).

Вектор pAAV.MHCK7.hSGCB был сконструирован путем удаления промотора tMCK и химерного интрона SV40 по сайтам NotI/KpnI и вставки амплифицированного с помощью ПЦР фрагмента, содержащего промотор MHCK7 и идентичный химерный интрон SV40 в сайты NotI/KpnI. MHCK7 является промотором на основе MCK, который использует энхансер 206 п.н., взятый из примерно 1,2 кб 5' сайта начала транскрипции в гене креатинкиназы эндогенных мышц с проксимальным промотором (enh358MCK, 584-bp)[3,12]. Сам промотор MHCK7 содержит данную модифицированную кассету CK7 из семейства генов MCK, лигированных с 188 п. н. α-MyHC (тяжелая цепь α-миозина) энхансером 5' части CK для усиления экспрессии в сердце 12. Часть промотора креатинкиназы (CK) на 96% идентична между tMCK и MHCK7. Наконец, вектор pAAV.MHCK7.hSGCB был сконструирован путем лигирования фаргмента 960 п. н. NotI/KpnI MHCK7+интрон из pAAV.MHCK7.DYSF5'DV44 в сайты NotI/KpnI pAAV.tMCK.hSGCB (Pozgai et al., Gene Ther. 23: 57-66, 2016).

Получение rAAV. Для создания rAAV вектора был применен модифицированный подход к перекрестной упаковке, ранее описанный Rodino-Klapac et al. (J. Trans. Med. 5:45, 2007). Здесь способ тройной трансфекции с осаждением $CaPO_4$ клеток HEK293 позволяет упаковывать ITA AAV2 в капсид AAV другого серотипа (28,29). Полученные плазмиды представляли собой: (i) pAAV.tMCK.hSGCB или pAAV.MHCK7.hSGCB, (ii) модифицированные AAV хелперные плазмиды rep2-caprh.74, кодирующие cap изолята rh.74 подобного серотипу 8, и (iii) типа 5 аденовируса хелперную плазмиду (pAdhelper), экспрессирующую гены аденовируса E2A, E4 ORF6 и VA I/II РНК. Векторы очищали и титр инкапсулированых гв (применяя детекторную систему Prism 7500 Taqman, PE Applied Biosystems, Карлсбад, Калифорния, США) определяли, как описано ранее (30). Праймер и флуоресцентный зонд были нацелены на промотор tMCK и представляли собой: форвардный праймер tMCK, 5'-ACC CGA GAT GCC TGG TTA TAA TT-3' (SEQ ID NO: 10); реверсный праймер tMCK, 5'-TCC ATG GTG TAC AGA GCC TAA GAC-3' (SEQ ID NO: 11); и tMCK-зонд, 5'-FAM-CTG CTG CCT GAG CCT GAG CGG TTA C-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 12). Праймер и флуоресцентный зонд были нацелены на промотор MHCK7 и представляли собой: форвардный праймер MHCK7, 5'-CCA ACA CCT GCT GCC TCT AAA-3' (SEQ ID NO: 16); реверсный праймер MHCK7, 5'-GTC CCC CAC AGC CTT GTT C-3' (SEQ ID NO: 17); и MHCK7-зонд, 5'-FAM-TGG ATC CCC-Zen-TGC ATG CGA AGA TC-3IABKFQ-3' (SEQ ID NO: 18).

Внутримышечная доставка генов. Для внутримышечной инъекции мышей анестезировали и удерживали под 1-4% изофлураном (в O^2). Передний отдел нижней левой конечности мышей SGCB$^{-/-}$ в возрасте 4-6 недель был очищен с помощью 95% EtOH, после чего в поперечную брюшную мышцу (TA)

вводили 3×10^{11} гв scAAVrh.74.tMCK.hSGCB, разведенного в физиологическом растворе, в объеме 30 мкл с использованием сверхтонкого инсулинового шприца 30 калибра. Контралатеральная мышца оставалась необработанной, чтобы служить контролем. Мышцы TA из обеих конечностей удаляли либо 6 (n=9, 4 самца, 5 самок), либо 12 (n=6, 4 самца, 2 самки) недель после инъекции для оценки эффективности переноса генов. В экспериментах с 6-месячными мышами (n=5, 5 самцов) лечение состояло из внутримышечной инъекции в левую TA 3×10^{11} гв scAAVrh.74. tMCK.hSCGB. Для экспериментов по изолированной перфузии конечностей мышам $sgcb^{-/-}$впрыскивали в возрасте 4 (n=5, 5 самцов) и 5 (n=4, 2 самца, 2 самки) недель 5×10^{11} гв scAAVrh.74. tMCK.hSCBB путем инъекции в бедренную артерию, как описано ранее (19). Животные были подвергнуты эвтаназии и мышцы были проанализированы через 8 недель после переноса гена.

Системная доставка генов: системная доставка была достигнута путем инъекции вектора в хвостовую вену мышей $sgcb^{-/-}$. Мышам вводили 1×10^{12} гв scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, разведенного в физиологическом растворе, в объеме 212 мкл с использованием ультратонкого шприца для инсулина 30 калибра. Мышей обездвиживали в удерживающей трубке, помещая хвост обратно через хвостовой паз, чтобы согреть его, чтобы расширить кровеносные сосуды для облегчения инъекции. После нахождения артерии по центральной линии хвоста инъекцию выполняли в одну из фиолетовых/синих боковых вен, которые проходят вдоль хвостовой артерии. Всех обработанных мышей инъецировали в возрасте 4-5 недель и подвергали эвтаназии через 6 месяцев после инъекции.

Производство силы EDL и защита от эксцентрических сокращений. Был выполнен физиологический анализ мышц EDL у мышей, обработанных путем изолированной перфузии (ILP). Мышцы EDL из обеих нижних задних конечностей обработанных мышей были иссечены по сухожилиям и были подвергнуты физиологическому протоколу для оценки функции, которая была ранее описана нашей лабораторией и другими (19, 31) с некоторыми адаптациями. Во время протокола эксцентричного сокращения процедуру 5% растяжения-повторного удлинения выполняли от 500 до 700 мс (5% растягивается в течение 100 мс, а затем возвращается к оптимальной длине за 100 мс). После протокола для тетануса и эксцентричного сокращения мышцу выдаляли, взвешивали в мокром состоянии, размещали в зажимочном устройстве с использованием трагаканта, а затем замораживали в метилбутане, охлажденном в жидком азоте.

Производство силы TA и защита от эксцентрических сокращений. Протокол оценки функциональных результатов мышцы TA выполняли на мышцах, выделенных из мышей, получавших IM инъекцию. Данная процедура TA описана в нескольких предыдущих исследованиях (32, 33). После эксцентрических сокращений мышей подвергали эвтаназии, и NA мышцу иссекали, взвешивали и замораживали для анализа. Анализ данных выполнялся вслепую, но не случайным образом.

Иммунофлуоресценция. Криосрезы (12 мкм) инкубировали с моноклональным анти-человеческий бета-саркогликан первичным антителом (Leica Biosystems, Нью Касл, Великобритания; кат. № NCL-Lb-SARC) при разведении 1:50 в блокирующем буфере (1×TBS (ТРИС-буферизированный физраствор), 10% козьей сыворотки, 0,1% Tween) в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере. Срезы затем промывали TBS три раза, каждая промывка 20 мин, и повторно блокировали в течение 30 мин. Конъюгированное с AlexaFluor 594 козье анти-мышиный IgG1 вторичное антитело (Life Technologies, Остров Гранд, Нью-Йорк, США; кат. № A21125) применяли при разведении 1:250 в течение 45 мин. Срезы промывали в TBS три раза, каждая промывка 20 мин, и закрепляли с помощью среды для заливки (Vector Laboratories, Бурлингейм, Калифорния, США). Четыре случайных ×20 изображений, охватывающих четыре разных сектора мышцы, были получены с использованием камеры Zeiss AxioCam MRC5. Процент волокон, положительных по окрашиванию бета-саркогликана (450% интенсивности окрашивания мышечной мембраны), определяли для каждого изображения и усредняли для каждой мышцы.

Анализ вестерн-блоттингом. Срезы тканей левой обработанной мышцы TA и правой контралатеральной мышцы TA (толщиной 20-20 микрон) собирали в микроцентрифуге и гомогенизировали 100 мкл буфера для гомогенизации (125 мМ Трис-HC1, 4% SDS, 4 М мочевины) в присутствии 1 таблетки смеси ингибиторов протеаз (Roche, Индианаполис, Индиана, США). После гомогенизации образцы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Количество белка определяли на NanoDrop (Thermo Scientific, Волтгем, Массачусетс, США). Образцы белка (20 мкг) подвергали электрофорезу в 3-8% полиакриламидном Tris-ацетатном геле (NuPage, Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) в течение 1 ч 5 мин при 150 В и затем переносили на мембрану PVDF (Amersham Biosciences, Пискатауэй, Нью-Джерси, США) в течение 1 ч 15 мин при 35 В. Мембрану блокировали в 5% обезжиренном сухом молоке в TBST (TBS с Tween 20) в течение 1 ч, а затем инкубировали с кроличьим поликлональным античеловеческий бета-саркогликан антителом (Novus Biologicals, Литлтон, Колорадо, США; кат. № NBP-1-90300 разведение 1:100 или 1:250) и 1:5000 моноклональным анти-мышиный гамма-тубулин антителом (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США; кат. № T6557) или разведенным 1:5000 мышиным моноклональным анти-мышиный а-актинин антителом (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США; кат. № A7811). Применяли разведение 1:500 кроличьих поликлональных анти-мышиный тропонин I сердца антител (Abeam, Кембридж, Массачусетч; кат. № ab47003) и разведение 1:1000 кроличьего анти-мышиный

винкулин моноклонального антитела (Invitrogen, Фредерик, Мериленд; кат. № 70062). Для иммунодетекции ECL (Enhanced chemiluminescence, усиленная хемолюминесценция) применяли анти-мышиные (Millipore, Биллерика, Массачусетс, США, кат. № AP308P) и анти-кроличьи (Life Technologies, кат. № 656120), вторичные HRP (пероксидаза хрена) антитела.

Анализ EBD. Дозу 3×10^{10} гв scAAVrh.74.tMCK.hSGCB вводили 4-недельным мышам $sgcb^{-/-}$ в левую TA внутримышечной инъекцией. Через 4 недели после инъекции мышей инъецировали во внутрибрюшинную полость с правой стороны 5 мкл/г массы тела стерилизованного фильтром 10 мг/мл EBD (краситель голубой эванс) в 1× фосфатном буферном растворе. Затем мышей умершвляли через 24 ч после инъекции, а ткани собирали и нарезали. Срезы фиксировали в холодном ацетоне в течение 10 мин, а затем использовали протокол иммунофлюоресценции для окрашивания бета-саркогликана человека.

Морфометрический анализ. Диаметры мышечных волокон и процент мишечных волокон с центрально расположенными ядрами определяли по мышцам TA и GAS, окрашенных гематоксилином и эозином (ГиЭ). Четыре случайных ×20 изображений для кажого среза для каждого животного были получены с помощью камеры Zeiss AxioCam MRC5. Центрально-нуклеированные волокна определяли количественно с использованием программного обеспечения NIH ImageJ (Бэтесда, Мэриленд, США). Диаметры волокон измеряли как самый короткий диаметр через мышечное волокно с использованием программного обеспечения Zeiss Axiovision LE4 (Carl Zeiss Microscopy, Мюнхен, Германия).

Анализ биоразспредиления с помощью количественного ПЦР. Применяли количественную ПЦР Taqman для определения количества копий геномов вектора, присутствующих в контралатеральной мышце мишени и не-мишени, а также органах-не-мишенях, как было описано выше (18, 30). Набор вектор-специфичного праймера-зонда применяли для амплификации последовательности интронной области непосредственно ниже промотора tMCK, которая является уникальной и расположенной в трансгенной кассете scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. В данном исследовании применяли следующие праймеры и зонд: форвардный праймер к tMCK и MHCK7 5'-GTG AGG CAC TGG GCA GGT AA-3'(SEQ ID NO: 13); реверсный праймер к интрону tMCK и MHCK7 5'-ACC TGT GGA GAG AAA GGC AAA G-3' (SEQ ID NO: 14); и зонд к интрону tMCK и MHCK7 5'-6FAM-ATC AAG GTT ACA AGA CAG-GTT TAA GGA GAC CAA TAG AAA-tamra-3' (IDT) (SEQ ID NO: 15). Количество копий подается как количество геномов вектора на микрограмм геномной ДНК. Иммуногистохимия для окрашивания иммунных клеток. Применяли иммуногистохимию для идентификации иммунных клеток. Замороженные срезы тканей на заряженых слайдах мироскопа Fisherbrand Superfrost инкубировали с крысиными моноклональными антимышиными моноклональными антителами с использованием набора HRP детекции анти-крысиный Ig (BD Pharmagen, Сан-Хосе, Калифорния, США, кат. № 551013): CD3 (кат. № 555273), CD4 (м 550280), CD8 (кат. № 550281) и Mac-3 для макрофагов (кат. № 550292). Все первичные антитела разводили 1:20 фосфатно-солевым буфером. Положительное иммуноокрашивание визуализировали с использованием DAB-хромагена, разведенного в DAB-буфере, с помощью Streptavidin-HRP-пероксидазы векстатин ABC пероксидазы. Были получены десять случайных ×40 изображений для каждой мышцы и каждое соответствующе окрашено. Количество моноядерных клеток подсчитывалось и выражалось как общее число на $мм^2$.

Окрашивание пикросириус красным и количественное определение коллагена. Замороженные срезы, размещенные на заряженных слайдах микроскопа Fisherbrand Superfrost, фиксировали в 10% нейтрально забуференном формалине в течение 5 мин, затем промывали в дистиллированной воде. Затем слайды инкубировали в растворе A (фосфомолибденовой кислоты) из набора окрашивания пикросириус красным (Polysciences Inc., Уоррингтон, Пенсильвания, США, кат. № 24901) в течение 2 мин. После тщательной промывки в дистиллированной воде слайды помещали в раствор B (Direct Red 80/246-Тринитрофенол) на 15 мин с последующим дополнительным промыванием в дистиллированной воде, и затем инкубировали в растворе C (0,1 N гидрохлорид) в течение 2 мин. Слайды докрашивали в течение 2,5 мин с помощью 1% Fast Green в 1% ледяной уксусной кислоте от Poly Scientific (кат. № S2114), используя разведение 1:10 в деионизированной воде. Наконец, слайды снова промывали в дистиллированной воде, дегидратировали в серийно разведенном этаноле, очищали в ксилоле и накрывали покровным стеклом, применяя среду Cytoseal 60 от Thermo-Scientific (Вогтгем, Массачусетс, США, кат. № 8310). Изображения были сделаны с использованием программного обеспечения AxioVision 4.9.1 (Carl Zeiss Microscopy). Для анализа окрашивания сириус красным и посчета % коллагена контраст между красным и зеленым цветами был усилен с использованием Adobe Photoshop. Был выбран плагин деконволюции цвета в программе ImageJ и был использован вариант деконволюции цвета RGB. Изображение Red включает в себя все соединительные ткани, окрашенные сириус красным. Изображение Green включает в себя все мышцы при контрастном окрашивании Fast Green. Использовались только изображение Red и исходное изображение. Затем к изображениям был применен порог генерации для получения черно-белых изображений с областями, положительными по коллагену в черном цвете и отрицательными областями в белом цвете. Используя функцию измерения, рассчитывали площадь коллагена. Затем общую площадь ткани определяли путем преобразования исходного изображения в "8-бит" и регулировки порога до 254, который является на единицу ниже полностью насыщенного изображения. Затем общую пло-

щадь ткани измеряли, как было сделано ранее, и записывали общую площадь. Процент коллагена затем рассчитывали путем деления площади коллагена на общую площадь ткани. Затем вычисляли средний процент для каждого индивида.

Тетаническое сокращение диафрагмы для функциональной оценки: Мышей подвергали эвтаназии и диафрагму отсекали от креплений с ребрами, а центральное сухожилие оставляли нетронутым, и помещали в буфер K-H, как описано ранее Beastrom et al. (Am. J. Pathol. 179: 2464-74, 2011), Rafael-Forney et al. (Circulation 124: 582-8, 2011) и Moorwood e t al. (J. Visualized Experiments 71:e50036, [год?]). Была получен срез диафрагмы шириной 2-4 мм. Полоски диафрагмы были крепко оплетены хирургическим шелком (6/0, Surgical Specialties, Reading, PA) по центральному сухожилью и сшиты через часть реберной кости, прикрепленной к дистальному концу полосы. Каждую мышцу переносили на водяную баню, заполненную кислородсодержащим раствором K-H, который поддерживали при 37°C. Мышцы были выровнены горизонтально и привязаны непосредственно между неподвижным штифтом и двухмодовым преобразователем силы - серводвигателем (305C; Aurora Scientific, Аврора, Онтарио, Канада). Два платиновых пластинчатых электрода были помещены в ванну для органа так, чтобы охватывать длину мышцы. Мышцу растягивали до оптимальной длины для измерения одиночных сокращений, и затем оставляли на 10 мин до начала тетанического протокола. Как только мышца стабилизировалась, мышцу размещали при оптимальной длине 1g и подвергали разминке, которая состояла из трех 1 Гц дерганий каждые 30 с, за которыми следовали три 150 Гц дергания каждую минуту. После 3-минутного периода покоя диафрагму стимулировали при 20, 50, 80, 120, 150, 180 Гц, обеспечивая период покоя в 2 мин между каждым стимулом, каждый с длительностью 250 мс для определения максимальной тетанической силы. Измеряли длину и массу мышц. Сила была нормирована по мышечному весу и длине.

Магнитно-резонансная томография сердца: сердечную функцию анализировали с использованием системы визуализации магнитным резонансом (МРТ) 9,4T и объемной катушки для мыши (Bruker BioSpin, Биллерика, Массачусетс, США). Мышей анестезировали 2,5% изофлураном, смешанным с карбогеном (1 л/мин) в течение 3 мин перед размещением на сканирующей кровати. При размещении мышей в сканирующем аппарате и начале визуализации смесь изофлуран/карбоген снижали до 1,5% в течение оставшейся части исследования. ЭКГ и дыхание контролировали с использованием МРТ-совместимой системы (Модель 1025, Small Animal Instruments, Стонибрук, Нью-Йорк, США). T1-взвешенные изображения cine FLASH короткой оси сердца при синхронизации были получены для всего левого желудочка (LV) мыши (TR=8 мс, TE=2,8 мс, α=18o, матрица=256×256, FOV=3,0×3,0 см, толщина среза=1 мм, число срезов=7, вплоть до 20 кадров на сердечный цикл). Для анализа изображения были идентифицированы конечная диастолическая и конечная систолическая точки времени каждого изображения по малой оси, а эндокардиальная и эпикардиальная сердечные границы были отслежены вручную. Папиллярные мышцы были исключены из эндокардиальной границы LV (левый желудочек). Из этих измеренных зон рассчитывали конечный диастолический объем (EDV), конечный систолический объем (ESV), ударный объем (SV), минутный объем сердца (CO), фракцию выброса (EF) и среднюю массу LV.

Иммунофлуоресценция: Замороженные срезы (12 мкм) передней большеберцовой мышцы (TA), икроножной мышцы (ГАС), четырехглавой мышцы (QUAD), поясничной мышцы (ПСОАС), ягодичной мышцы (GLUT), трицепса (TRI) и диафрагмы вместе с сердцем подвергали иммунофлюоресцентному окрашиванию на трансген hSGCB с помощью нашего ранее использованного протокола, как описано в Pozgai et al., Gene Therap. 23: 57-66, 2016. Срезы инкубировали с мышиным моноклональным античеловеческий бета-саркогликан первичным антителом (Leica Biosystems, Нью Касл, Великобритания; кат. № NCL-Lb-SARC) при разведении 1:100. Четыре случайных ×20 изображений, охватывающих четыре разных сектора мышцы, были получены с использованием камеры Zeiss AxioCam MRC5. Процент волокон, положительных по окрашиванию бета-саркогликана (>50% окрашивания мышечной мембраны) определяли для каждого изображения и усредняли для каждой мышцы.

Морфометрический анализ: окрашивание гематоксилином и эозином (ГиЭ) проводили на 12 мкм криосрезах мышц из 7-месячных мышей C57BL6 ДТ (n=5), мышей $sgcb^{-/-}$ (n=5) и обрабатываемых 6 месяцев rAAV.MHCK7.hSGCB мышей $sgcb^{-/-}$ (n=5) для анализа. Процент миофибрил с центральными ядрами определяли в мышцах TA, GAS, QUAD, PSOAS, GLUT, TRI и диафрагме. Кроме того, диаметры мышечных волокон измеряли в мышцах GAS, PSOAS, и TRI. Четыре случайных ×20 изображений для каждой мышцы для каждого животного были получены с помощью камеры Zeiss AxioCam MRC5. Подсчитывали центрально-нуклеированные волокна с использованием программного обеспечения NIH ImageJ и диаметры волокон измеряли, применяя программное обеспечение Zeiss Axiovision LE4.

Рентгеновские снимки: рентгеновские снимки всего тела получали на анестезированных 7-месячных мышах C57BL6 ДТ (n=6), необработанных мышах $sgcb^{-/-}$ (n=6) и обрабатываемых 6 месяцев rAAV.MHCK7.hSGCB мышах $sgcb^{-/-}$ (n=6) с использованием цифровой рентгеновской системы Faxitron MX-20 при 26 кВ в течение 3 с (Faxitron X-Ray Corp, Линкольншир, США).

Лазерный мониторинг активности в клетках с открытым пространством: для определения общей активности экспериментальных мышей применяли камеру активности в открытом пространстве. Мышей в возрасте 7 месяцев из контрольных групп C57BL6 ДТ (n=6) и необработанных $sgcb^{-/-}$ (n=6) вместе с

обрабатываемыми 6 месяцев rAAV.MHCK7.hSGCB мышами $sgcb^{-/-}$ (n=6) подвергали анализу в соответствии с ранее описанным протоколом (Kobayashi et al., Nature 456: 511-5, 2008, Beastrom et al., Am. J. Pahol. 179: 2464-74, 2011) с несколькими модификациями. Все мыши были протестированы в одно и то же время дня ранним утром, а затем в конце ночного цикла, когда мыши наиболее активны. Всех мышей тестировали в изолированной комнате, при тусклом свете, и это делал один и тот же человек каждый раз. Чтобы уменьшить беспокойство и свести поведенческие изменения к минимуму, что может потенциально повлиять на нормальную активность мышей и, следовательно, результаты анализа, тестируемых мышей не размещали индивидуально (Voikar et al., Genes Brain Behav. 4: 240-52, 2005). За активностью мышей наблюдали, применяя Photobeam Activity System (San Diego Instruments, Сан-Диего, Калифорния). Эта система использует сетку невидимых инфракрасных световых лучей, которые пересекают камеру сверху и донизу, и справа налево, чтобы наблюдать за позицией и движением мыши в плоскостях XYZ. Активность регистрировали в течение 1 ч с 5-минутными интервалами. Мышей предварительно приспосабливали к комнате тестирования активности в течение начальной 1-часовой сессии за несколько дней до начала сбора данных. Мышей тестировали в индивидуальных камерах по 4 за раз. Оборудование для тестирования чистили каждый раз перед применением, чтобы снизить реакционные поведенческие отклонения у мышей, которые могли бы изменить наши результаты. Собранные данные были преобразованы в рабочий лист Microsoft Excel, и все вычисления были выполнены в программе Excel. Отдельные прерывания лучей при движении в плоскостях x и Y были добавлены для каждой мыши, чтобы воспроизвести общую способность к передвижению, а прерывания лучей в плоскости Z были добавлены для получения вертикальной активности в течение 1-часового периода времени.

Пример 1. Конструкция scAAVrh.74.tMCK.hSGCB и эффективность вектора.

Была сконструирована трансгенная кассета, содержащая полноразмерную кодон-оптимизированную кДНК человеческого SCGB, как показано на фиг. 1A. Кассета включает в себя консенсусную последовательность Козак (CCACC), химерный интрон SV40, синтетический сайт полиаденилирования и специфичный для мышц промотор tMCK (20), применяемый для управления экспрессией кассеты. Кассета была упакована в самокомплементарный (sc) AAV вектор rh.74, который на 93% гомологичен AAV8. Было показано, что AAVrh.74 является безопасным и эффективным в мышах и приматах, отличных от человека, особенно при преодолении сосудистого барьера, при доставке в мышцу через систему кровообращение (17, 18, 21). Эффективность вектора была установлена путем внутримышечной инъекцией в левую TA мыши Sgcb-null. Доставка 3×10^{10} гв трансдуцировала 70,5±2,5% мышечных волокон, и 1×10^{11} гв трансдуцировала 89,0±4,0% мышечных волокон, через 3 недели после переноса гена.

Пример 2. Внутримышечная доставка scAAVrh.74.tMCK.hSGCB.

После тестирования эффективности вектора, исследования были расширены, чтобы проанализировать эффективность терапии через 6 и 12 недель после переноса гена. В результате высокого уровня экспрессии после короткого 3-недельного исследования эффективности, для применения в последующих исследованиях была выбрана наиболее низкая эффективная общая доза 3×10^{10} гв. Пятинедельных мышей $sgcb^{-/-}$ обрабатывали 3×10^{10} гв scAAVrh.74.tMCK.hSCGB внутримышечно в левую поперечную брюшную мышцу (TA) и экспрессия β-саркогликана была продемонстрирована с использованием иммунофлуоресценции в 88,4±4,2% мышечных волокон через 6 недель после инъекции (n=9), и в 76,5±5,8% мышечных волокон через 12 недель после инъекции (n=6), и экспрессия была подтверждена посредством вестерн-блоттинга (фиг. 1B). Экспрессия β-саркогликана сопровождалась восстановлением компонентов белкового комплекса, связанных с дистрофином (a-саркогликан и дистрофии) (фиг. 1C). Применяя краситель голубой эванс (EBD - Evans blue dye) в качестве маркера проницаемости мембраны (22, 23), мы обнаружили, что все волокна, экспрессирующие экзогенный β-саркогликан, были защищены от утечки и включения EBD (фиг. 1D). Мышцы из мышей $sgcb^{-/-}$показали сильную мышечную дистрофию с центрально-нуклеированными волокнами, частым некрозом мышечных волокон, фиброзной тканью и значительной изменчивостью размера волокон, представленную как атрофическими, так и гипертрофическими волокнами (3, 4). Как показано на фиг. 2A, окрашивание гематоксилином и эозином демонстрирует общее улучшение дистрофического фенотипа пораженной мышцы, включая восстановление центральных ядер (необработанные $sgcb^{-/-}$ - 76,8±2,3% по сравнению с обработанным AAV.hSCGB - 38,86±3,5%, P<0,0001) (фиг. 2C). Также наблюдалась нормализация распределения размеров волокон с увеличением среднего диаметра волокна после обработки (необработанные $sgcb^{-/-}$- 32,6±0,31 мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - 35,56± 0,22 мкм, P<0,0001) (фиг. 2D).

Гистопатологическим отличительным признаком мыши $scgb^{-/-}$ является фиброз, характеризующийся обширной заменой мышечной ткани в основном коллагенами наряду с другими внеклеточными матричными компонентами, такими как фибронектин, эластин, ламинин и декорин (14). Эта замена мышечной ткани соединительной тканью является вызовом для потенциальной ценности замены генов и может ограничить степень улучшения (24). Для проверки этого, мышей, которых лечили в течение 12 недель, анализировали на предмет уменьшения фиброза. Специально оценивали мышцу TA, поскольку ее наследуемая степень фиброза была воспроизведена в модели KO, и потому, что она представляет собой потенциальную мишень генной доставки с помощью ILV через сосуды. Окрашивание пикросириус красным

коллагена типов I и III мышц TA показало значительное снижение (52,74%) количества коллагена, присутствующего в обработанных scAAVrh.74.tMCK.hSGCB мышцах, по сравнению с необработанными мышцами мышей scgb$^{-/-}$ (20,7± 0,57% по сравнению с 43,8±2,3%, обработанные AAV.hSGCB против необработанных sgcb$^{-/-}$ соответственно, P<0,0001) (фиг. 2b и e). Необработанная мышца мышей scgb-/- в возрасте 5 недель на момент инъекции имела 24.05±1.5% отложения коллагена, что указывает на небольшое (14,0%) снижение количества коллагена после 12 недель лечения.

Пример 3. Исправление функции в скелетных мышцах после генного переноса scAAVrh.74.tMCK.hSGCB.

Чтобы определить, может ли перенос гена hSGCB улучшать мышечную функцию, мы провели оценивание функциональных свойств мышцы TA у мышей scgb$^{-/-}$, обработанных scAAVrh.74.tMCK.hSCGB. После внутримышечной доставки 3×10^{10} гв scAAVrh.74.tMCK.hSCGB в TA 4-недельных мышей scgb$^{-/-}$, через 6 недель после обработки мышцы TA были подвергнуты измерениям силы in situ (n=4). Обработанные мышцы сравнивались с необработанными контралатеральными мышцами и теми из мышей C57BL/6 ДТ. Обработанная scAAVrh.74.tMCK.hSCGB мышца показала значительное улучшение как абсолютной тетанической силы, так и нормированной удельной силы (фиг. 3A и B). Обработанные мышцы имели среднюю абсолютную силу 1436,9±199,5 мН по сравнению с 770,9±118,3 мН необработанных контрольных scgb$^{-/-}$ (P<0,01). Аналогично, обработанные мышцы TA производили среднюю удельную силу, составляющую 254,01±6,9 мН/мм^2, а необработанные мышцы производили 124,2±13,9 мН/мм^2 силы (P<0,01). Наконец, мышцы, обработанные scAAVrh.74.tMCK.hSCGB, показали большую устойчивость к травме, вызванной сокращением, по сравнению с необработанными контрольными мышцами (фиг. 3C). Обработанные мышцы TA потеряли 34,0±5,1% силы, произведенной после первого сокращения, тогда как необработанная больная мышца потеряла 54,1 ±3,8% (P<0,01) силы после выполнения протокола эксцентрического сокращения. Эти данные показывают, что перенос гена hSGCB действительно обеспечивает функциональное улучшение в подверженной болезни мышце, недостаточной по β-саркогликану.

Пример 4. Лечение старых мышц с помощью scAAVrh.74.tMCK.hSGCB.

Исследования прогрессирования заболевания в данной мышиной модели LGMD2E показали, что хотя наиболее тяжелое ремоделирование тканей в мышцах происходит между 6 и 20 неделями, гистопатология мышцы продолжает ухудшаться с возрастом, напоминая прогрессирование заболевания у пациентов (3, 4,14). Следовательно, для имитации клинической ситуации, когда лечение будет осуществляться в более старшем возрасте при более развитых мышечных повреждениях и эндомизиальном фиброзе, мы лечили 6-месячных мышей sgcb$^{-/-}$(n=5) внутримышечно в TA с помощью 3×10^{10} гв scAAVrh.74.tMCK.hSCGB. После 12 недель лечения, в возрасте 9 месяцев, 80,1±4,8% мышечных волокон были трансформированы (фиг. 4A). Окрашивание пикросириус красным коллагена типов I и III показало значительное снижение 42,2% количества коллагена, присутствующего в обработанных мышах, по сравнению с необработанной мышцей мыши scgb$^{-/-}$ (обработанные AAV.hSGCB - 20,0±0,80% по сравнению с необработанной scgb$^{-/-}$ -34,6±1,4%, P<0,0001) (фиг. 4B и C). В возрасте лечения, 6-месячные scgb-/- мыши имели 30,8±2,0% отложения коллагена (n=4, 4 самцы); таким образом, данные результаты показывают, что лечение с помощью scAAVrh.74.tMCK.hSCGB не только предотвращает, но также имеет потенциал для устранения существующего фиброза.

Пример 5. ILP scAAVrh.74.tMCK.hSGCB у мышей sgcb$^{-/-}$.

Возможность делать мишенями несколько мышц на одной конечности делает возможным более клинически релевантный метод доставки для переноса пациентам LGMD2E. Доставку 5×10^{11} гв scAAVrh.74.tMCK.hSGCB ILP в 4-6-недельных мышей scgb$^{-/-}$ (n=9, 7 самцов, 2 самки) анализировали через 2 месяца после переноса гена. Экспрессия β-саркогликана достигала 91,8±4,7% волокон в икроножной мышце (GAS) и 90,6±2,8% в TA (фиг. 5A). ILP-доставка scAAVrh.74.tMCK.hSGCB привела к значительному повышению защиты от повреждения, вызванного эксцентрическим сокращением (P<0,05), которое не отличалось от ДТ, по сравнению с необработанными контралатеральными мышцами (фиг. 5C). Доставка через сосуды также восстановила гистопатологические параметры мышц (фиг. 5B).

Центральные ядра были уменьшены в TA (необработанные sgcb$^{-/-}$76,9±2,8% по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - 23,2±5,7%, P<0,001) и GAS (необработанные scgb$^{-/-}$ - 78,2±2,4% по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - 16,8±6,6%, P<0,001). Перенос гена также приводил к увеличению среднего размера волокна в TA (необработанные scgb$^{-/-}$ - 30,53±0,52 мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - 41,9±0,46 мкм, P<0,0001) и GAS (необработанные scgb$^{-/-}$ - 38,9±0,37 мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - 33,3±0,44 мкм, P<0,0001), с нормализацией распределения диаметра волокна. Наблюдали существенное уменьшение (примерно 60%) числа клеток CD3, клеток CD4 и макрофагов (табл. 1).

Таблица 1

Иммунный ответ в ILP-обработанных scAAVrh.74.tMCK.hSGCB мышей

Тип клетки	Обработанная левая ТА клеток/мм^2	Необработанная правая ТА клеток/мм^2	Неинъецированные ТА *SGCB-/-* клеток/мм^2
CD3	15,6 ± 3,2	37,85 ± 6,2	29,8 ± 1,7
CD4	20,9 ± 4,7	58,1 ± 2,9	49,0 ± 0,8
CD8	8,2 ± 1,8	12,7 ± 2,4	15,5 ± 5,8
Макрофаг	28,2 ± 5,0	75,2 ± 5,6	100,2 ± 5,9

Аббревиатуры: ДА, дисперсионный анализ; ILP, изолированная перфузия конечности; SGCB, β-саркогликан; ТА, передняя большеберцовая мышца. Подсчет количества иммунных клеток, представленных в неинъецированных мышах SGCB$^{-/-}$, и мышцах обработанных и необработанных scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. Показаны данные после ILP-доставки вируса, и представляют среднее число клеток/мм^2±с.о.с., n=8 в группе. Односторонний дисперсионный анализ применяли для сравнения значений из трех разных групп. Количества иммунных клеток были уменьшены с статистически достоверной разницей (P<0,01) между обработанной левой ТА, и необработанной правой ТА и/или обработанной левой ТА и неинъецированной ТА у всех штаммах за исключением для CD8.

Окрашивание пикросириус красным мышц ТА и GAS также показало значительное снижение количества коллагена по сравнению с необработанной мышцей sgcb$^{-/-}$ после доставки через сосуды (фиг. 6A). Уровни коллагена в ТА уменьшались до 21,6±1,3% в обработанной мышце по сравнению с 40,2±1,5% у необработанных scgb$^{-/-}$ мышей в возрасте конечной точки иследования (P<0,0001). Как указывалось ранее, у мышей scgb$^{-/-}$ в возрасте инъекции было 24,1±1,5% коллагена в мышце ТА, что указывало на небольшое снижение (10,0%) отложения коллагена после 8 недель лечения. Аналогично, окрашивание мышцы GAS показало, что у обработанных мышей было 22,9±0,99% коллагена по сравнению с 37,9±1,3% у необработанных мышей scgb$^{-/-}$ в конечной точки иследования (P<0,0001). Выполняли качественную ПЦР для выявления уровней транскрипта коллагена в мышце, которые коррелировали с результатами окрашивания сириус красным. В совокупности эти данные показывают, что AAV-опосредованная доставка человеческого β-саркогликана уменьшает мышечный фиброз, улучшает мышечную функцию и обращает вспять дистрофическую патологию подверженной заболеванию мышцы scgb$^{-/-}$.

Пример 6. Безопасность и биораспределение rAAVrh.74.tMCK.hSGCB.

Первоначально нормальные мыши ДТ, инъецированные 3×10^{10} гв scAAVrh.74.tMCK.hSGCB внутримышечно в ТА, не проявляли признаков токсичности по ГиЭ-окраске, что указывало на отсутствие неблагоприятных эффектов, вызванных вирусом. После ILP-доставки через сосуды 5×10^{11} гв общей дозы scAAVrh.74.tMCK.hSGCB, как описано в предыдущем разделе, безопасность оценивали у небольшой группы мышей в данной группе (n=4). Во-первых, гистологично были проанализированы мышцы-мишени со значительной генной экспрессией, а также органы-не-мишени, включая сердце, легкие, печень, почку, селезенку, гонады и диафрагму. Парафиновые срезы были соответственно рассмотрены ветеринарным патологоанатомом, и не было обнаружено доказательств токсичности в каком-либо указанном органе (данные не показаны). Экспрессия белка и векторное биораспределение были также оценены во всех вышеуказанных тканях и органах с помощью вестерн-блоттинга и кЦПР соответственно. Копии генома вектора были обнаружены во всех проверенных органах; однако экспрессия белка не была обнаружена ни в одном образце, кроме обработанной мышцы (фиг. 7). Наконец, анализ масс обработанной и необработанной влажных мышц не показывает существенных различий или тенденций при сравнении средних масс по сравнению с главной группой (данные не показаны). Эти данные свидетельствуют о том, что специфический для мышц промотор tMCK ограничивал экспрессию до скелетной мышцы, и вектор является нетоксичным.

Пример 7. Гистологические и функциональные дефекты в сердце и диафрагме мышей SGCB$^{-/-}$.

Мыши ДТ и 7-месячные SGCB$^{-/-}$ (n=6 на штамм), которые не были обработаны, были проанализированы с помощью МРТ сердца и физиологии диафрагмы для поиска дефектов. После данных анализов животных умерщвляли и оценивали гистопатологию (фиг. 8). Трехцветное окрашивание показало обширный фиброз (окрашивание красным) как в диафрагме (фиг. 8A), так и в сердце (фиг. 8C). Это сопровождалось функциональной недостаточностью удельной силы в диафрагме (116,24 мН/мм^2 SGCB$^{-/-}$ по сравнению с 236,67 мН/мм^2 ДТ, фиг. 8B) и значительной недостаточностью фракции выброса, измеренной с помощью МРТ (ДТ, 78% в сравнении с SGCB$^{-/-}$ 65%, фиг. 8D).

Пример 8. Конструкция scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB и эффективность вектора.

Была сконструирована трансгенная кассета, содержащая полноразмерную кодон-оптимизированную кДНК SCGB человека, как показано на фиг. 9A. Кассета включает в себя консенсусную последовательность Козак (CCACC), химерный интрон SV40, синтетический сайт полиаденилиро-

вания и специфичный для мышц MHCK7, применяемый для управления экспрессией кассеты. Это промотор на основе MCK, который использует энхансер 206 п.н., взятый из примерно 1,2 кб 5' сайта начала транскрипции в гене креатинкиназы эндогенных мышц с проксимальным промотором (enh358MCK, 584-bp)[3,12]. Кассета была упакована в самокомплементарный (sc) AAV вектор rh.74, который на 93% гомологичен AAV8. Было показано, что AAVrh.74 является безопасным и эффективным в мышах и приматах, отличных от человека, особенно при преодолении сосудистого барьера, при доставке в мышцу через систему кровообращение (17, 18, 21). Эффективность вектора была установлена путем внутримышечной инъекцией в левую TA мыши Sgcb-null. Доставка 3×10^{10} гв трансдуцировала >90% мышечных волокон через 4 недели после переноса гена.

Пример 9. Системная доставка scAAV.MHCK7.hSGC.

Мы доставляли вектор через инъекцию в хвостовую вену 14 мышам $SGCB^{-/-}$ в дозе 1×10^{12} гв общей дозы (5×10^{13} гв/кг) для оценки экспрессии трансгена и эффективности нашего вектора при системной доставке с длительным шестимесячным контрольным моментом времени. Мышей инъецировали в возрасте 4 недель, и полное вскрытие было проведено через 6 месяцев после инъекции (1 мышь убрали из исследования через 1 месяц, а 2 мыши - через 4 месяца в качестве промежуточных оценок экспрессии). Все скелетные мышцы, обсуждавшиеся выше, вместе с диафрагмой и сердцем были извлечены для анализа. Органы также изымали для анализа токсикологии и биораспределения.

Иммунофлуоресцентное окрашивание бета-саркогликана человека использовали для определения экспрессии трансгена hSGCB в 5 мышцах конечностей, как левых, так и правых, в дополнение к диафрагме и сердцу 6 мышей KO, которым давали системную инъекцию вектора hSGCB. Данные мышцы включали TA, икроножную мышцу (GAS), четырехглавую мышцу (QUAD), ягодичную мышцу (GLUT) (не показана), поясничную мышцу (PSOAS) и трицепс (TRI) (фиг. 10). Качественный анализ сердечной ткани также использовался для оценки относительного уровня экспрессии трансгена в сердечной мышце после доставке.

Четыре изображения 20× были получены для каждой мышцы, и для каждого изображения был определен процент положительных волокон hSGCB, в результате чего получали средний процент трансдукции для каждой мышцы из каждой мыши. Результаты, показанные на фиг. 10 и фиг. 11, демонстрируют трансдукцию ≥98% во всех проанализированных мышцах, включая диафрагму и сердце. У мышей, недостаточных по β-саркогликану, полностью отсутствовал белок как показал анализ иммунофлюоресценции. Терапевтическая доза в виде общей дозы 1×10^{12} гв приводила к средней трансдукции вектором 97,96±0,36% (±СОС) у всех скелетных мышцах, включая диафрагму, и примерно к 95% или больше в сердечной мышце (данные не показаны).

Пример 10. Долгосрочная системная доставка scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB мышам $SGCB^{-/-}$.

Исследовали длительную (6-месячную) системную доставку трансгенной кассеты β-саркогликана у мышей $sgcb^{-/-}$, для получения результатов по анализу одномесячной эффективности, описанному в примере 9. Мышей $sgcb^{-/-}$ 4-5-недельного возраста обрабатывали общей дозой 1×10^{12} гв scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB внутривенно через хвостовую вену (n=5). Мыши были вскрыты через 6 месяцев после инъекции, и экспрессия трансгена hSGCB была продемонстрирована с использованием иммунофлуоресценции в шести скелетных мышцах, как левых, так и правых, в дополнение к диафрагме и сердцу, у всех обработанных мышей. Скелетные мышцы, которые анализировали, включали в себя TA, GAS, QUAD, ягодичную мышцу (GLUT), PSOAS и TRI. Средняя экспрессия hSGCB, вызванная системной доставкой, у обработанных мышей составила 98,13±0,31% (±СОС) для всех скелетных мышц, включая диафрагму, с экспрессией в сердце, превышающей >95%. Репрезентативные изображения показаны на фиг. 12b. Уровни экспрессии в каждом отдельном типе мышц, усредненные для всех обработанных мышей, показаны в табл. 2. Вестерн-блоттинг, как показано на фиг. 12c, подтверждает экспрессию трансгена во всех мышцах. Значения экспрессии в Таблице 2 представлены для различных мышц как среднее значение левой и правой мышц из инъецированных системно мышей (n=5). Значения указаны как среднее ±СОС. Кроме того, количественное определение экспрессии трансгена hSGCB в сердцах у обработанных мышей с помощью вестерн-блоттинга и денситометрии указывает на избыточную экспрессию hSGCB вплоть до 72,0% выше уровня экспрессии BL6 ДТ (фиг. 12d), что коррелирует с высокими уровнями, определенными в скелетной мышце.

Таблица 2

Иммунофлуоресценция экспрессии β-саркогликана

Мышца	Путь доставки	Доза (гв Общая доза)	Конечная точка (месяцы)	% Волокон, экспрессирующих SGCB
TA	IV (внутривенно)	1e12	6	98,88 ± 0,55
GAS	IV (внутривенно)	1e12	6	98,24 ± 0,82
QD	IV (внутривенно)	1e12	6	99,32 ± 0,19
GLUT	IV (внутривенно)	1e12	6	97,50 ± 0,39
PSOAS	IV (внутривенно)	1e12	6	98,75 ± 0,23
TRI	IV (внутривенно)	1e12	6	97,21 ± 1,35
Диафрагма	IV (внутривенно)	1e12	6	97,00 ± 1,26
Сердце	IV (внутривенно)	1e12	6	≥95%

Важная характеристика мышцы $sgcb^{-/-}$, описанная в предыдущих сообщениях (Araishi et al., Hum. Mol. Genet 8: 1589-98, 1999, Durbeej et al., Mol. Cell. 5:141-51, 2000) и проиллюстрированная окрашиванием гематоксилином и эозином GAS и диафрагмы на фиг. 13a, представляет собой тяжелую дистрофическую патологию, включающую центральное нуклеирование, некроз, воспалительную инфильтрацию и фиброз. Генный перенос значительно улучшил состояние данной патологии, облегчая многие из этих дистрофических признаков (фиг. 13a). Количественная оценка гистологических параметров показала значительное снижение центрального нуклеирования в различных скелетных мышцах, проанализированных в результате генного переноса (фиг. 13b). При ожидаемых низких уровнях центрального нуклеирования у мышей BL6 ДТ во всех мышцах в среднем составляющих 1,89±0,39%, как отмечено в данном документе, с учетом всех проанализированных мышц, в среднем 66,85±1,86% центральных ядер у необработанных мышей $ssgcb^{-/-}$ по сравнению с 36,30±5,16% в обработанной AAV.MHCK7.hSGCB мышце $sgcb^{-/-}$ ($p < 0,0001$) в табл. 3 ниже приведены подсчеты центральных ядер и диаметров волокон для различных мышц в виде среднего (±СОС) левой и правой мышц из BL6 ДТ, $sgcb^{-/-}$ и системно инъецированных мышей (n=5 в группе). Следует отметить, что наиболее значительная волна разрушения/восстановления происходит через 3 недели в мышце $sgcb^{-/-}$, признаком чего служат центрально размещенные ядра. Животных лечили после такого повреждения, и поэтому не ожидалось полного восстановления центральных ядер. Более глубокий анализ гистопатологии мышц показал нормализацию распределения размеров волокон, сопровождающуюся увеличением среднего диаметра волокна у больных мышей, обработанных вектором, по сравнению с необработанными мышами $sgcb^{-/-}$ у всех трех исследованных мышцах (GAS: необработанные $sgcb^{-/-}$ - 28,37±0,23 мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - 36,04±0,17 мкм, $p<0,0001$) (PSOAS: необработанные $sgcb^{-/-}$ - 24,75±0,23 мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - 38,43±0,28 мкм, $p<0,0001$) (TRI: необработанные $sgcb^{-/-}$ - 28±0,31 мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - 35,56±0,22 мкм, $p<0,0001$) (фиг. 13c, 13d, табл. 3).

Таблица 3

Анализ процентного центрального нуклеирования

Группа животных	Доза (гв Общая доза)	Мышца	% Центральных ядер (Среднее± СОС)	Комбинированное средне % ЦЯ (± СОС)	Диаметр волокна мкм (Среднее± СОС)
C57BL6 ДТ	N/A	TA	1,78 ± 0,86	1,89 ± 0,39	N/A
		GAS	0,83 ± 0,41		39,69 ± 0,18
		QD	0,98 ± 0,31		N/A
		GLUT	2,50 ± 0,68		N/A
		PSOAS	1,26 ± 0,28		40,96 ± 0,22
		TRI	2,13 ± 0,36		41,53 ± 0,24
		DIA	3,75 ± 1,30		N/A
Sgcb$^{-/-}$	N/A	TA	70,45 ± 3,04	66,85 ± 1,86	N/A
		GAS	67,26 ± 1,81		28,37 ± 0,23
		QD	63,57 ± 2,09		N/A
		GLUT	61,34 ± 2,05		N/A
		PSOAS	62,73 ± 5,20		24,75 ± 0,22
		TRI	67,11 ± 2,83		28,74 ± 0,22
		DIA	75,47 ± 3,79		N/A
Обработанные AAV.MHCK7.hSGCB	1,00E+12	TA	43,85 ± 3,89	36,30 ± 5,16	N/A
		GAS	38,71 ± 3,50		36,04 ± 0,18
		QD	46,10 ± 6,26		N/A
		GLUT	42,11 ± 5,48		N/A
		PSOAS	21,00 ± 4,69		38,43 ± 0,28

		TRI	48,39 ± 6,20		39,92 ± 0,27
		DIA	11,59 ± 2,08		N/A

Из-за значимой роли фиброза в патогенезе LGMD2E и эффективности терапии было важно продемонстрировать ту же эффективность в снижении фиброза. Это было обнаружено с локализованным переносом гена β-саркогликана сразу же после системной доставки scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. Применяя окрашивание пикросирус красным коллагена типов I и III, мы проанализировали уровни коллагена в икроножных мышцах и диафрагме у 7-месячных мышей BL6 ДТ (n=4), необработанных мышей $sgcb^{-/-}$ (n=4), и обработанных мышей $sgcb^{-/-}$ (n=5) через 6 месяцев после инъекции. Обработанные мышцы показали значительно меньшее отложение коллагена по сравнению с необработанными мышцами $sgcb^{-/-}$ (фиг. 14a). Трансдуцированная вектором мышца GAS содержала 17,55±0,59% коллагена по сравнению с 43,55±3,33% коллагена в необработанных мышцах GAS $sgcb^{-/-}$ ($p<0,0001$). Кроме того, обработанная диафрагма имела 21,67±1,09% коллагена по сравнению с 44,05±2,39% в необработанной мышцей $sgcb^{-/-}$ ($p<0,0001$) (фиг. 14b), демонстрируя способность переноса гена hSGCB уменьшать фиброзный компонент фенотипа LGMD2E.

Пример 11. Восстановление функции диафрагмы после системной доставки.

Чтобы определить, может ли перенос гена hSGCB улучшить функцию мышц, мы оценили функциональные свойства диафрагменной мышцы у мышей $SGCB^{-/-}$, обработанных scAAVrh.74.MHCK7.hSCGB (см. Griffin et al. для методов). Сначала установили наличие функциональной недостаточности в диафрагмах мышей $SGCB^{-/-}$. Диафрагмы КО продемонстрировали снижение удельной силы на 50,9% (116,24 мН/мм^2) по сравнению с мышами BL6 ДТ (116,24 мН/мм^2 по сравнению с 236,67 мН/мм^2) и большую потерю силы после протокола интенсивного утомления (потеря 23% в $SGCB^{-/-}$; потеря 7% в BL6 ДТ). Доставка scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB через хвостовую вену привела к почти 100% экспрессии hSGCB в диафрагме, приводя к восстановлению функции диафрагмы с удельной силой, улучшенной до 226,07 мН/мм^2, и большей устойчивостью к усталости с потерей только 12% силы (n=5) (фиг. 15).

Пример 12. Доставка scAAVrh.74.CMV.miR29C уменьшает фиброз у мышей $SGCB^{-/-}$.

Обширный фиброз, который мы идентифицировали как в скелетной мышце (фиг. 2, 4, так и 6), так и в сердце и диафрагме (фиг. 8), продемонстрировал необходимость лечения отложения коллагена (фиброза) при LGMD2E. Ранее мы обнаружили, что при мышечной дистрофии Дюшенна наиболее сильно была уменьшена Mir29C (из Mir29A, B и C). Было предположено, что Mir-29C также будет уменьшена у мышей с недостаточностью по бета-саркогликану (мышиная модель LGMD2E). Мы доказали, что является правдой (фиг. 15). Количества Mir29C были снижены, уровни фиброза (коллагена) были увеличены, а три компонента фиброза (Co1A, Co13A и Fbn) были увеличены на уровне РНК. Чтобы проверить, можем ли мы предотвратить фиброз с помощью Mir29C, в переднюю большеберцовую мышцу 4-недельных мышей $SGCB^{-/-}$ (n=5) вводили геннотерапевтический вектор scrAAVrh.74.CMV.miR29c (3×10^{11} гв). scrAAVrh.74.CMV.miR29c показан на фиг. 16 и описан в предварительной заявке США 62/323163, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Через 2 месяца лечения с помощью AAVrh.74.CMV.miR29C мышцы TA собирали у обработанных и контрольных мышей $SGCB^{-/-}$, и мышей ДТ, и анализировали на фиброз (уровни коллагена) (n=5 в группе). Применяя окрашивание сириус красным и количественное определение, обнаруживали что уровни коллагена снижался после лечения (см. фиг. 17). Количества транскриптов Col1A, Col3A и Fbn нормализировались, а размер мышечных волокон увеличивался. Репрезентативные изображения отсканированных полных срезов необработанных и обработанных AAVrh.74.CMV.miR29C передних большеберцовых мышц, окрашенных сириусом красным, который окрашивает коллаген 1 и 3, показаны на фиг. 18. Это свидетельствует о том, что scAAVrh.74.CMV.miR29C снижает фиброз у мышей $SGCB^{-/-}$ и может применятся в комбинации с заменой гена с помощью scAAVrh.74.tMCK.hSGCB или scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB.

Пример 13. Внутривенный перенос гена мышам $SGCB^{-/-}$ уменьшает кифосколиз грудного отдела позвоночника.

Вырождение мышц туловища из-за ухудшающейся гистопатологии у пациентов, страдающих от LGMD2E, можно отнести к кифозу. Кифосколиоз грудного отдела позвоночника из-за ослабления мышц, поддерживающих позвоночный столб, может привести к тому, что диафрагма будет выдвинута вперед, что еще больше ухудшит объем легких и функцию диафрагмы. Была использована рентгенография всего тела для определения степени кифоза у 7-месячных мышей BL6 ДТ (n=6), мышей $sgcb^{-/-}$ (n=6) и обработанных мышей $sgcb^{-/-}$ через 6 месяцев после инъекции (n=6), из-за тяжести фенотипа у мыши $sgcb^{-/-}$ с общим анатомическим видом кифосколиоза. Балл кифотического индекса (KI) определяет количественное значение степени кифосколиза (Laws et al. J. Appl. Physiol. 97: 1970-7, 2004). Как показано на панели ДТ на фиг. 19a, балл KI представляет собой отношение длины от передней к задней конечности по сравнению с длиной средней линии к вершине кривизны в позвоночнике. В то время как мыши $sgcb^{-/-}$имели

сильно изогнутый позвоночник и более низкий показатель KI 3,64±0,16 (n=6), мыши BL6 ДТ имеют значительно более прямой позвоночник, что дает более высокую оценку KI 6,01±0,41 (n=6) (p<0,01) (фиг. 19b). Обработанные мыши sgcb-/- демонстрируют значительное снижение степени кифоза позвоночника с увеличением показателя KI до 5,39±0,58 (n=6) (p<0,05) (фиг. 19b). Эти данные показали, что внутривенная доставка scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB полезна для общей целостности позвоночника и может облегчить кифоз и суставные контрактуры, присутствующие при данной болезни. Эти данные продемонстрировали облегчение кифоза и увеличение физической активности у мышей $sgcb^{-/-}$ после системной доставки rAAV вектора согласно изобретению. Эти данные являются дополнительным доказательством того, что генная терапия согласно изобретению улучшает качество жизни пациентов с LGMD2E.

Пример 14. Оценка кардиомиопатии.

Гистологическое разрушение мышц конечностей и диафрагмы также обнаружено в миокарде 7-месячных мышей $sgcb^{-/-}$, особенно с проявлением некроза миокарда и фиброза, как видно по окрашиванию ГиЭ и пиркосириус красного (фиг. 20a). Презентация нарушения функции сердца часто в виде расширенной кардиомиопатии с уменьшенным минутным объемом сердца и меньшей фракцией выброса (Semplicini et al., Neurology 84: 1772-81, 2015, Fanin et al., Neuromuscul Disorder 13:303-9, 2003). Была использована магнитно-резонансная томография сердца (МРТ) для оценки нескольких функциональных параметров сердца с целью установления функциональной недостаточности в миокарде мышей $sgcb^{-/-}$ по сравнению с мышами BL6 ДТ для использования в качестве меры измерения функциональности. Визуализация контрольных мышей в возрасте 7 месяцев показала снижение на 29,4% ударного объема с 0,041±0,0019 мкл у сердец $sgcb^{-/-}$ по сравнению с 0,029±0,0024 мл у сердец BL6 ДТ (p<0,01), на 31,7% меньший минутный объем сердца с 14,70±0,74 мкл/мин у сердец $sgcb^{-/-}$ по сравнению с 12,72±0,97 мл/мин у сердец BL6 ДТ и, наконец, на 14,3% меньшую фракцию выброса, 66,21±3,83% у сердец $sgcb^{-/-}$ по сравнению с 76,90±1,67% у сердец BL6 ДТ (p<0,05) (фиг. 20b). Это указывает на умеренное снижение общей сердечной функции в этом возрасте и тенденцию к развитию кардиомиопатии. Восстановление экспрессии hSGCB в сердцах мышей КО через системную доставку частично исправляло данные недостаточности, улучшая ударный объем до 0,032±0,0027 мл, минутный объем сердца до 14,66±0,75 мл/мин и фракцию выброса до 68,16±2,31% (фиг. 19b). Как показал вестерн-блоттинг, коррелирующая с гистологическим и функциональным нарушением сердечной ткани, описанным в данном документе, экспрессия сердечного тропонина I (cTrpI), важного регулятора сердечной функции и индикатора (биомаркер) сердечного повреждения, уменьшена в сердцах больных $sgcb^{-/-}$ до 60,38% уровней, наблюдаемых у мышей BL6 ДТ (фиг. 20c). Уровни cTrpI восстанавливаются после лечения до уровней 35,80% экспрессии, наблюдаемой в сердцах ДТ (фиг. 20d).

Пример 15. Функциональное восстановление в мышцах диафрагмы с увеличением физической активности.

Поскольку при LGMD2E значительными являются диафрагмальная дисфункция и респираторная недостаточность, при клинической оценке системной терапии важно учитывать функциональную пользу для диафрагмы. Применяя экспериментальный протокол ex vivo на полосках, взятых из диафрагменной мышцы, было оценено, приносит ли востановления β-саркогликана функциональную пользу в этой сильно нарушенной мышце. В соответствии со значительной гистопатологией, выявленной в диафрагмах 7-месячных больных мышей, диафрагмы $sgcb^{-/-}$ (n=4) проявили функциональную недостаточность со значительным (51%) уменьшением удельной силы по сравнению с мышами BL6 ДТ (n=5) (116,24±10,49 мН/мм^2 по сравнению 236,67±15,87 мН/мм^2, соответственно, p<0,001), а также большую потерю силы, по сравнению с той, что была произведена после первого сокращения после выполнения протокола интенсивного утомления (23±1,0% потери у $sgcb^{-/-}$; 7,0±3,0% потери у BL6 ДТ, p <0,05) (фиг. 6a). Через шесть месяцев после доставки через хвостовую вену scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB наблюдалось резкое улучшение удельной силы. Удельная сила увеличивалась до 226,07±27,12 мН/мм^2 (n=5) (p<0,05 по сравнению с $sgcb^{-/-}$), и наблюдали лучшую защиту мышц от повторяемого утомления с потерей силы только на 12,0±4,0% (p<0,05 по сравнению с $sgcb^{-/-}$) (фиг. 21a). В целом, эти данные подтверждают наши предыдущие результаты по мышце TA и показывают, что восстановление β-саркогликана обеспечивает функциональное восстановление мышцы диафрагмы.

Симптомы повышенного утомления и снижение общей активности часто сообщаются при многих нервно-мышечных заболеваниях, что частично связано с возникновением кифоза. В результате и с учетом фенотипа LGMD2E было высказано предположение, что мыши КО будут, естественно, менее активными по сравнению с здоровыми мышами ДТ, и, кроме того, системная доставка rAAV.MHCK7.hSGCB мышам $sgcb^{-/-}$ сделает мышей более физически активными. Чтобы проверить данную гипотезу и дополнительные потенциальные функциональные преимущества генного переноса, для всех групп мышей выполняли протокол лазерного наблюдения активности в клетках с открытым пространством, аналогичный описанному в Kobayashi et al., Nature 456: 511-5, 2008 and Beastrom et al., Am. J. Pathol. 179: 2464-74, 2011. Графики на фиг. 21b демонстрируют значительное снижение (55,5%) у мышей КО по сравнению с ДТ как общей способности передвигаться (горизонтальное движение в плоскостях x и y), так и вертикального передвижения на задних конечностях. Среднее число прерываний лазерных лучей горизонталь-

ного перемещения в течение 1 ч у мышей ДТ составляло 7355±400,8 (n=6) по сравнению с 3271±483,8 (n=6) у мышей КО ($p<0,0001$). Кроме того, среднее число прерываний лазерных лучей вертикального перемещения, зарегистрированное у мышей ДТ, составляло 626,7±53,76 по сравнению с 264,5±63,36 у мышей КО ($p<0,01$) (фиг. 21b). В соответствии с исходной гипотезой, обработанные rAAV.MHCK7.hSGCB мыши, были заметно более активными по сравнению с КО, что было проиллюстрировано в количественной оценке активности, когда общее перемещение увеличилось на 22% до 5143±293,2 прерываний лазерных лучей ($p<0,05$) и вертикальное перемещение на задних лапах резко увеличилось на 77% до 615,3±95,93 прерываний лазерных лучей ($p<0,05$) у обработанных мышей (n=6) (фиг. 21b).

Пример 16. Анализ безопасности и биораспределения rAAVrh.74.MHCK7.hSGCB.

Потенциальную токсичность или проблемы безопасности генной терапии hSGCB оценивали на мышах $sgcb^{-/-}$ через 6 месяцев после системной доставки scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB в общей дозе $1,0\times10^{12}$ гв (5×10^{13} гв/кг). Биораспределение вектора и экспрессию трансгена вне мишени анализировали по образцах тканей (TA, TRI, диафрагма, сердце, гонады, легкие, почка, печень и селезенка) из дозированных вектором $sgcb^{-/-}$ животных, с использованием кПЦР и вестерн-блоттинга, соответственно. Применяя наборы вектор-специфичных праймеров-зондов, геномы вектора MHCK7.hSGCB были обнаружены в различных количествах во всех собранных тканях. Как и ожидалось, самые высокие уровни наблюдали в печени, а также в скелетной мышце и сердце, что указывало на то, что испытуемое изделие эффективно доставлялось во все предполагаемые мышцы мышей, дозированных вектором (фиг. 22a). Кроме того, вестерн-блоттинг для определения экспрессии белка hSGCB подтвердил функциональность специфичного для мышц промотора MHCK7 и экспрессию трансгена, ограниченную сердечной и скелетной мышцами. Экспрессию белка бета-саркогликана наблюдали в различных количествах во всех образцах скелетных мышц, а также в образцах из сердец и, что важно, не обнаруживали ни в одной другой немышечной ткани (фиг. 22b), что подтверждается тем фактом, что бета-саркогликан известен как специфичный для мышц белок. Наконец, проводили окрашивание гематоксилином и эозином криосрезов мышечной ткани и всех органов не-мишеней, собранных у пяти мышей $sgcb^{-/-}$, и пяти мышей C57BL6 ДТ, обработанных системно нашим вектором в терапевтической дозе, применяемой в данном исследовании. Затем данные срезы были соответственно рассмотрены на токсичность ветеринарным патологоанатомом, и ни в одном образце из любой мыши не было обнаружено никаких вредных эффектов. В совокупности эти данные показывают, что испытуемое изделие хорошо переносилось испытуемыми животными.

Тот факт, что такие высокие уровни трансдукции во всех мышцах по всему телу были достигнуты без побочных эффектов с использованием относительно низкой дозы (общая доза 1×10^{12} гв, 5×10^{13} гв/кг), предоставляет большие перспективы для практического применения пациентами LGMD2E. С клинической точки зрения, доза, применяемая в описанных в данном документе экспериментах, намного ниже дозы, применяемой для системной доставки препарата AAV, экспрессирующего SMN1, предоставляемого младенцам с SMA (спинальная мышечная атрофия), который в настоящее время находится на этапе клинических испытаний (Mendell et al., Mol. Ther. 24: S190, 2016). Высокоэффективное восстановление экспрессии β-саркогликана с использованием промотора MHCK7, сопровождающееся функциональными улучшениями, очень обнадеживает при уровнях дозировки, которые могут быть применены клинически, и системная доставка приносит большую пользу данным пациентам учитывая высокую затрагиваемость сердца при недостаточности β-саркогликана у пациентов с LGMD2E.

Список литературы

1 Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E et al. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. Nat Genet 1995; 11: 266-273.

2 Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. J Neuropathol Exp Neurol 2006; 65: 995-1003.

3 Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. Hum Mol Genet 1999; 8: 1589-1598.

4 Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL et al. Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. Mol Cell 2000; 5: 141-151.

5 Bonnemann CG, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, de Sa Moreira E, Marie SK et al. Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). Hum Mol Genet 1996; 5: 1953-1961.

6 Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. Neurology 1999; 52: 176-179.

7 Sandona D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. Exp Rev Mol Med 2009; 11: e28.

8 Fanin M, Melacini P, Boito C, Pegoraro E, Angelini C. LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy. Neuromusc Disord 2003; 13: 303-309.

9 Sveen ML, Thune JJ, Kober L, Vissing J. Cardiac involvement in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2 and Becker muscular dystrophy. Arch Neurol 2008; 65: 1196-1201.

10 Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danieli GA et al. Heart involvement in muscular dystrophies

due to sarcoglycan gene mutations. Muscle Nerve 1999; 22: 473-479.

11 Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G et al. Evidence-based guideline summary: diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology and the practice issues review panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. Neurology 2014; 83: 1453-1463.

12 Wong-Kisiel LC, Kuntz NL. Two siblings with limb-girdle muscular dystrophy type 2E responsive to deflazacort. Neuromusc Disord 2010; 20: 122-124.

13 Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnoni R, Vitali A, Felisari G et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. J Med Genet 2000; 37: 102-107.

14 Gibertini S, Zanotti S, Savadori P, Curcio M, Saredi S, Salerno F et al. Fibrosis and inflammation are greater in muscles of beta-sarcoglycan-null mouse than mdx mouse. Cell Tissue Res 2014; 356: 427-443.

15 McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. Gene Ther 2003; 10: 2112-2118.

16 McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. Gene Ther 2001; 8: 1248-1254.

17 Chicoine LG, Rodino-Klapac LR, Shao G, Xu R, Bremer WG, Camboni M et al. Vascular delivery of rAAVrh74.MCK.GALGT2 to the gastrocnemius muscle of the rhesus macaque stimulates the expression of dystrophin and laminin alpha2 surrogates. Mol Ther 2014; 22: 713-724.

18 Rodino-Klapac LR, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Malik V, Davis N et al. Persistent expression of FLAG-tagged

micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. Mol Ther 2010; 18: 109-117.

19 Rodino-Klapac LR, Janssen PM, Montgomery CL, Coley BD, Chicoine LG, Clark KR et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. J Transl Med 2007; 5: 45.

20 Wang B, Li J, Fu FH, Chen C, Zhu X, Zhou L et al. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. Gene Ther 2008; 15: 1489-1499.

21 Chicoine LG, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Griffin DA, Heller KN et al. Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on micro-dystrophin gene expression following vascular delivery. Mol Ther 2014; 22: 338-347.

22 Matsuda R, Nishikawa A, Tanaka H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. J Biochem 1995; 118: 959-964.

23 Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. J Cell Biol 1997; 139: 375-385.

24 Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. Mol Ther 2015; 23: 192-201.

25 Dressman D, Araishi K, Imamura M, Sasaoka T, Liu LA, Engvall E et al. Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. Hum Gene Ther 2002; 13: 1631-1646.

26 Rodino-Klapac LR, Lee JS, Mulligan RC, Clark KR, Mendell JR. Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D. Neurology 2008; 71: 240-247.

27 Shield MA, Haugen HS, Clegg CH, Hauschka SD. E-box sites and a proximal reg-ulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expres¬sion in diverse skeletal

muscles and cardiac muscle of transgenic mice. Mol Cell Biol 1996; 16: 5058-5068.

28 Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. J Virol 2002; 76: 791-801.

29 Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. Nat Protoc 2006; 1: 1412-1428.

30 Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR. Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. Hum Gene Ther 1999; 10: 1031-1039.

31 Liu M, Yue Y, Harper SQ, Grange RW, Chamberlain JS, Duan D. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. Mol Ther 2005; 11: 245-256.

32 Hakim CH, Grange RW, Duan D. The passive mechanical properties of the extensor digitorum longus muscle are compromised in 2- to 20-mo-old mdx mice. J Appl Physiol 2011; 110: 1656-1663.

33 Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szigyarto CA, Maiti B, Findlay A et al. Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. Nat Med 2014; 20: 992-1000.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный AAV вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую β-саркогликан, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

2. Рекомбинантный AAV вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

3. Рекомбинантный AAV вектор по любому из п.1 или 2, причем вектор имеет серотип AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 или AAV rh.74.

4. Рекомбинантный AAV вектор по любому из пп.1-3, в котором полинуклеотидная последовательность содержит регуляторный элемент, специфичный для мышц.

5. Рекомбинантный AAV вектор по п.4, в котором регуляторный элемент, специфичный для мышц, представляет собой человеческий элемент гена актина скелетных мышц, элемент гена актина сердца, миоцит-специфичный связывающий энхансер фактор mef, мышечную креатинкиназу (MCK), усеченную MCK (tMCK), тяжелую цепь миозина (MHC), MHCK7, C5-12, энхансерный элемент мышиной креатинкиназы, элемент гена тропонина C быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемент гена тропонина C медленно сокращающихся мышечных волокон сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон, элемент ответа на индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (gre).

6. Рекомбинантный AAV вектор по п.5, в котором регуляторный элемент, специфичный для мышц, представляет собой усеченный промотор MCK (tMCK).

7. Рекомбинантный AAV вектор по п.6, в котором усеченный промотор MCK (tMCK) содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

8. Рекомбинантный AAV вектор по п.4, в котором регуляторный элемент, специфичный для мышц, представляет собой промотор MHCK7.

9. Рекомбинантный AAV вектор по п.8, в котором промотор MHCK7 содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

10. Рекомбинантный AAV вектор по любому из пп.1-5, содержащий нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 3.

11. Рекомбинантный AAV вектор по любому из пп.1-5, содержащий нуклеотидную последователь-

ность, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 3.

12. Рекомбинантный AAV вектор по любому из пп.1-5, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

13. Композиция, содержащая рекомбинантный AAV вектор по любому из пп.1-12.

14. Способ лечения мышечной дистрофии у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV вектора по любому из пп.1-12 или композиции по п.13.

15. Способ увеличения мышечной силы у субъекта-млекопитающего, страдающего мышечной дистрофией, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV вектора по любому из пп.1-12 или композиции по п.13.

16. Способ увеличения мышечной массы у субъекта-млекопитающего, страдающего мышечной дистрофией, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV вектора по любому из пп.1-12 или композиции по п.13.

17. Способ уменьшения фиброза у субъекта-млекопитающего, страдающего мышечной дистрофией, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV вектора по любому из пп.1-12 или композиции по п.13.

18. Способ уменьшения травмы, вызванной сокращением, у субъекта-млекопитающего, страдающего мышечной дистрофией, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV вектора по любому из пп.1-12 или композиции по п.13.

19. Способ лечения β-саркогликанопатии у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV вектора по любому из пп.1-12 или композиции по п.13.

20. Способ по любому из пп.14-19, в котором субъект страдает мышечной дистрофией лимба-пояса.

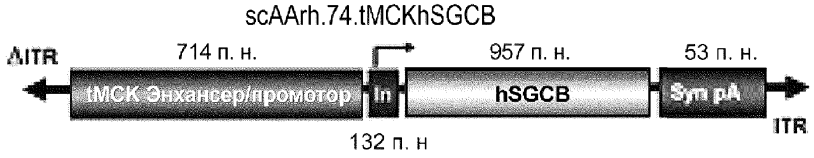
21. Способ по любому из пп.14-20, в котором рекомбинантный AAV вектор или композицию вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

22. Способ по любому из пп.14-20, в котором рекомбинантный AAV вектор или композицию вводят системно.

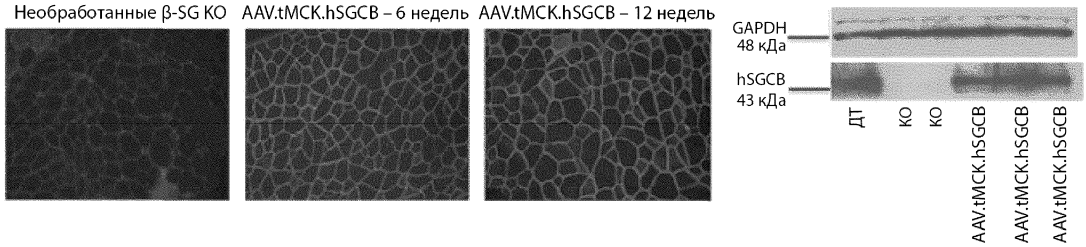
23. Способ по п.22, в котором рекомбинантный AAV вектор или композиция представляет собой парентеральное введение путем инъекции, инфузии или имплантации.

24. Способ по любому из пп.14-23, дополнительно включающий введение второго рекомбинантного AAV вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

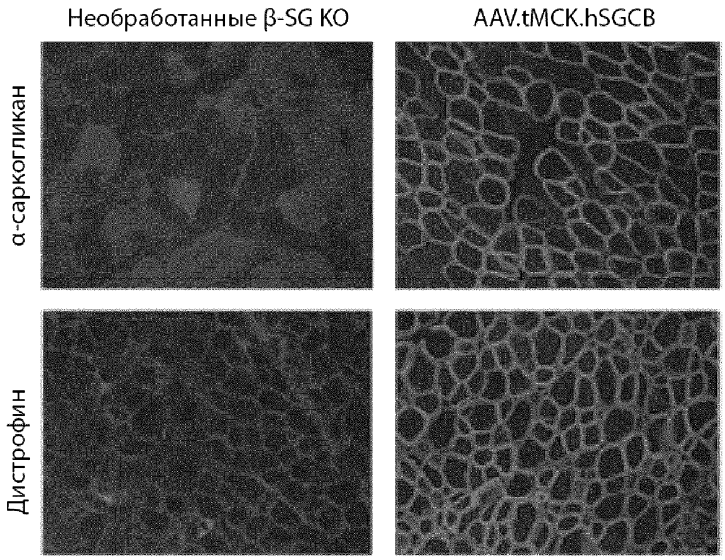
25. Способ по п.24, в котором второй рекомбинантный AAV вектор вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.



Фиг. 1А

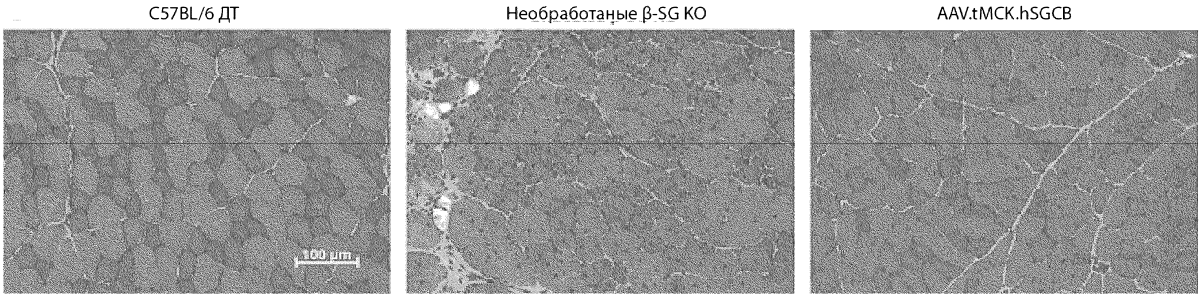


Фиг. 1В

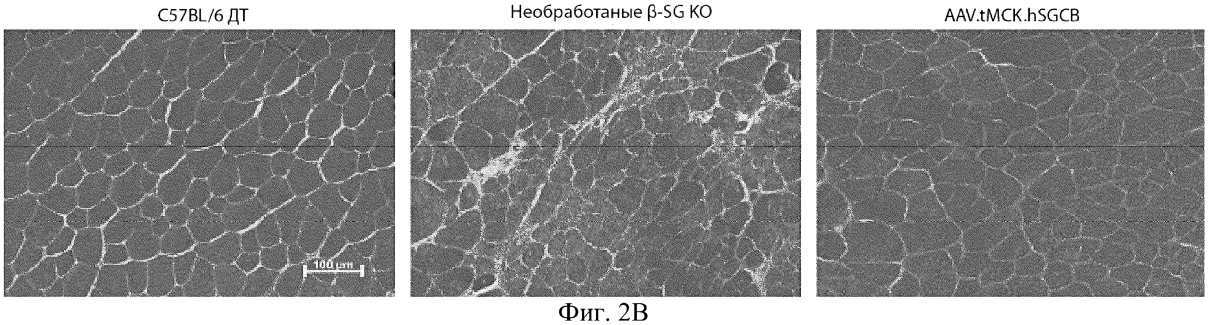


Фиг. 1C

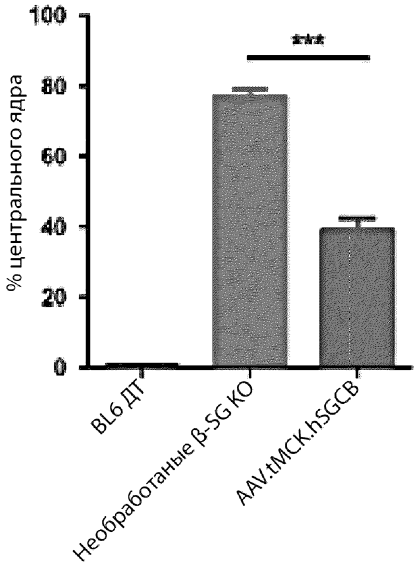
Фиг. 1D



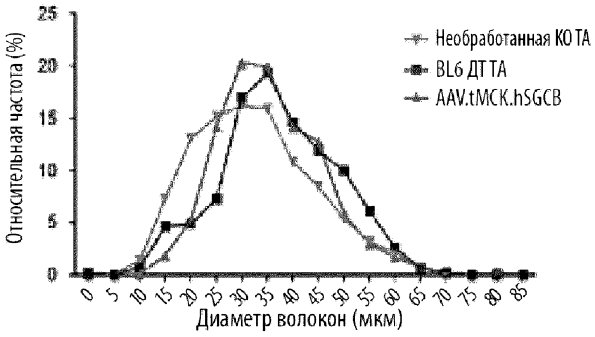
Фиг. 2A



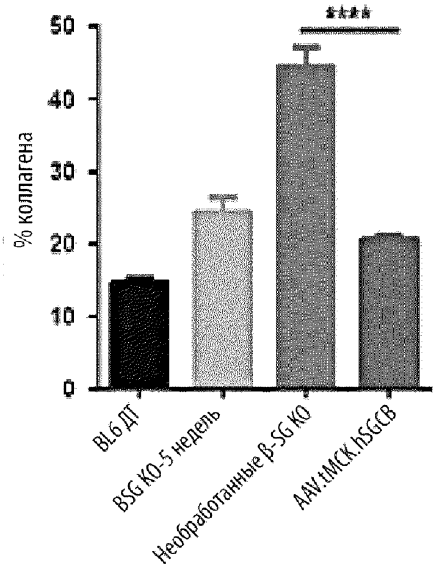
Фиг. 2B



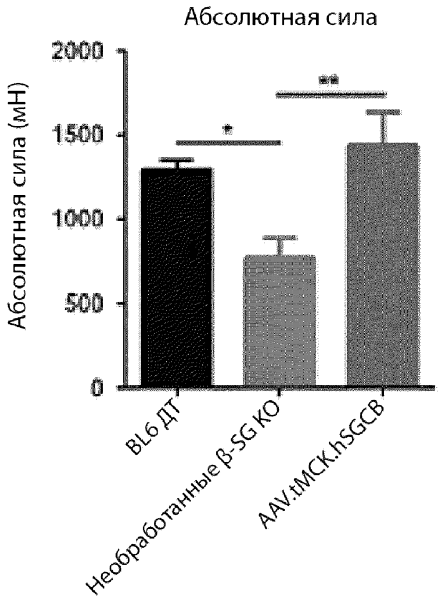
Фиг. 2C



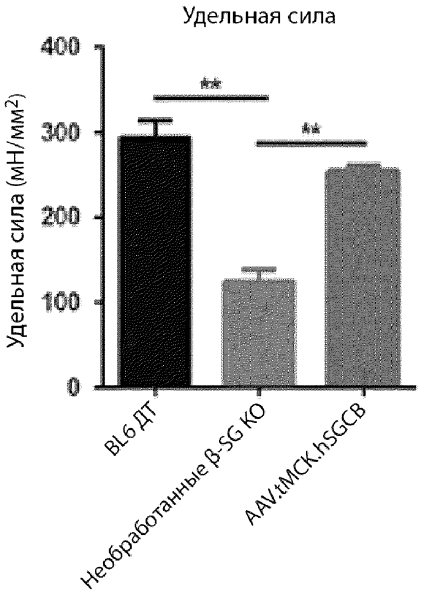
Фиг. 2D



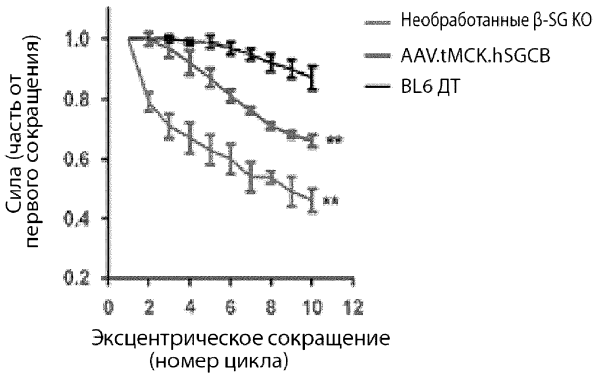
Фиг. 2E



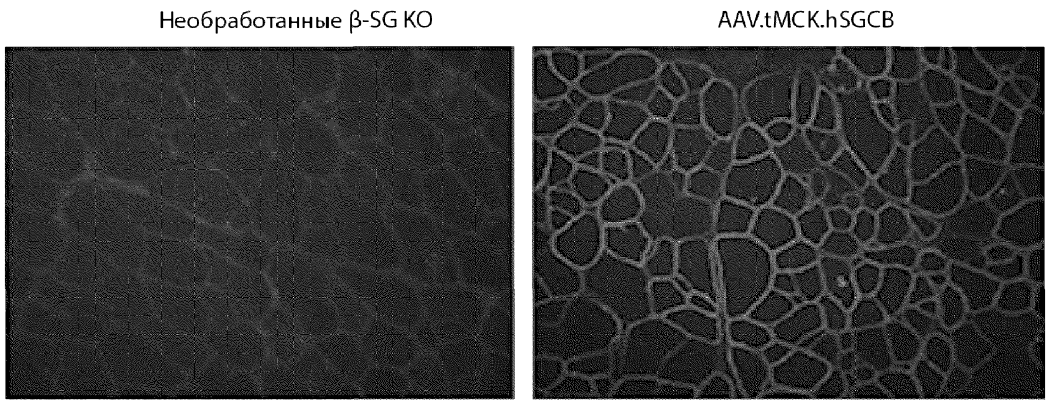
Фиг. 3A



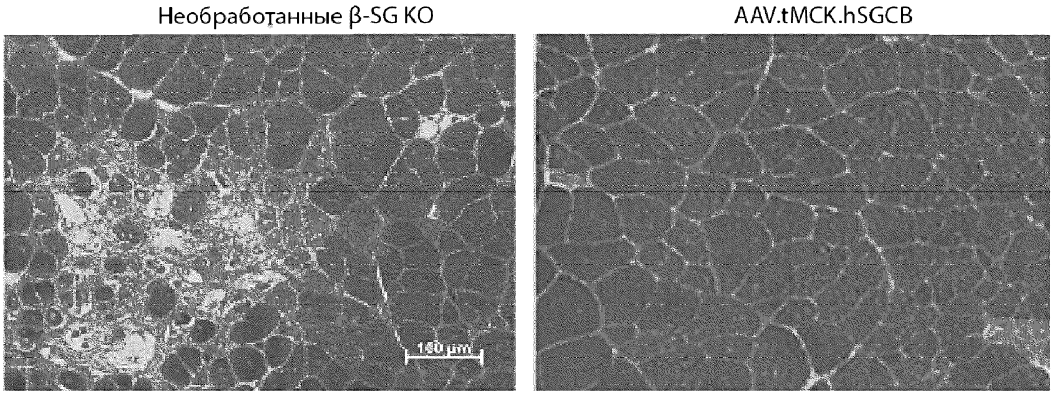
Фиг. 3B



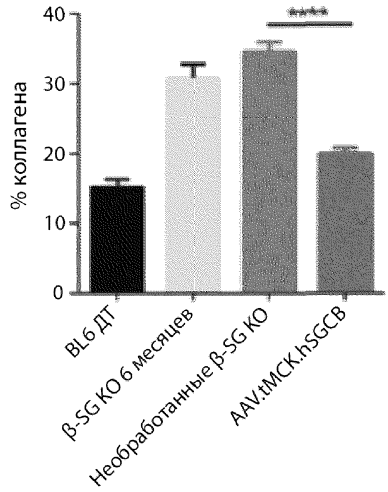
Фиг. 3C



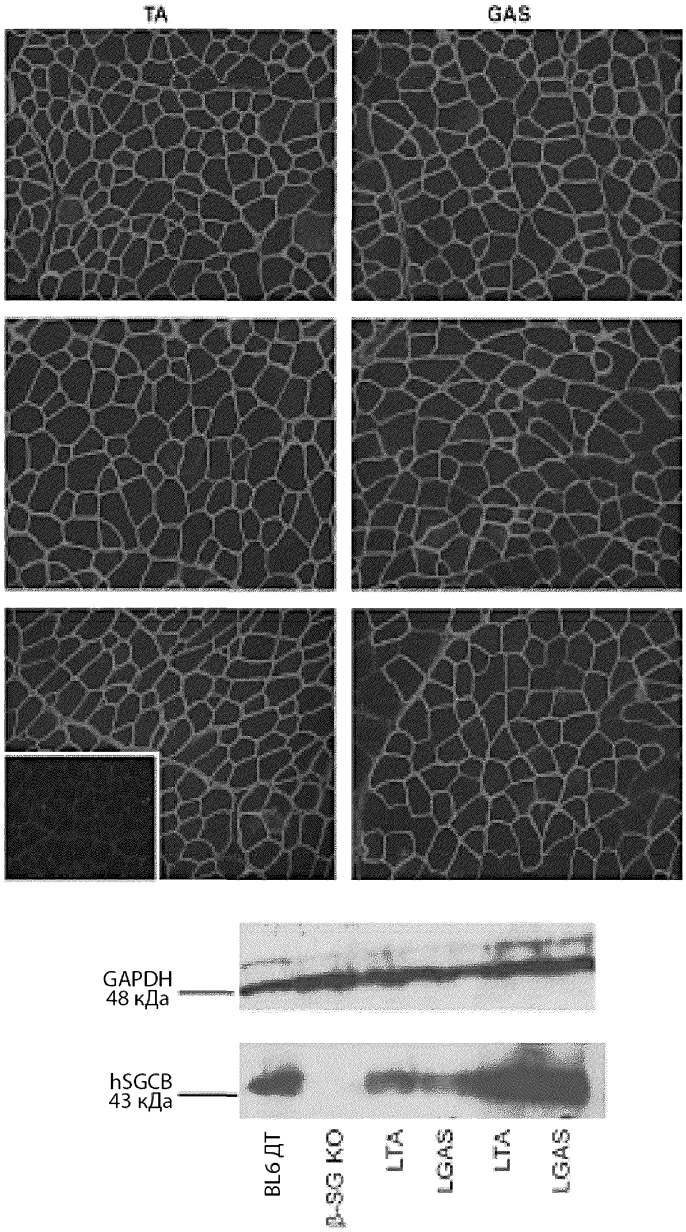
Фиг. 4A



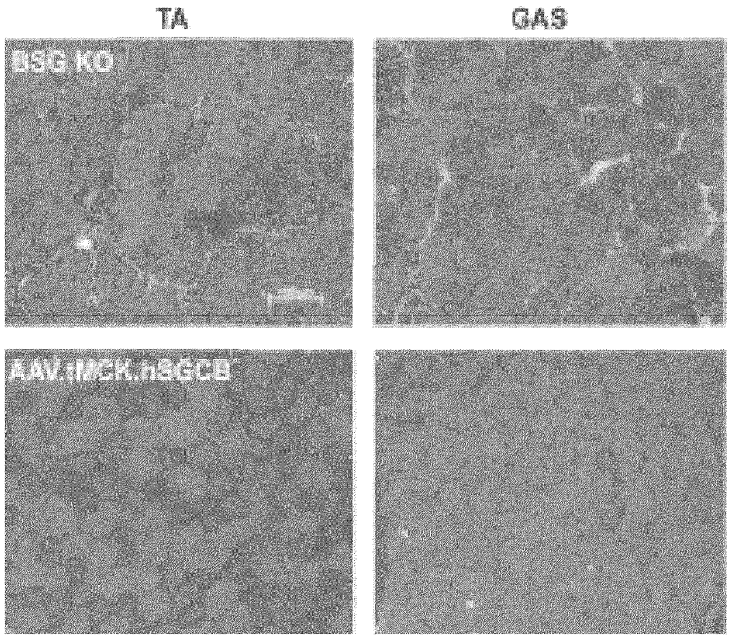
Фиг. 4B



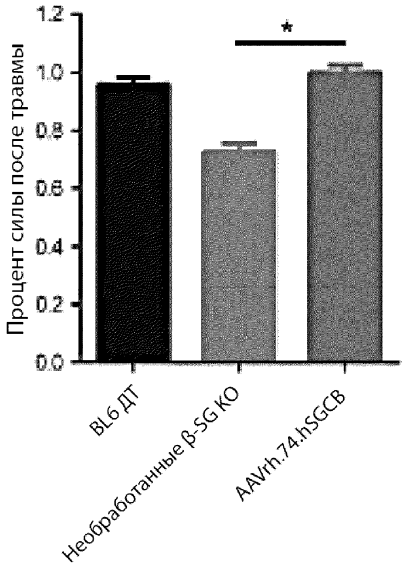
Фиг. 4C



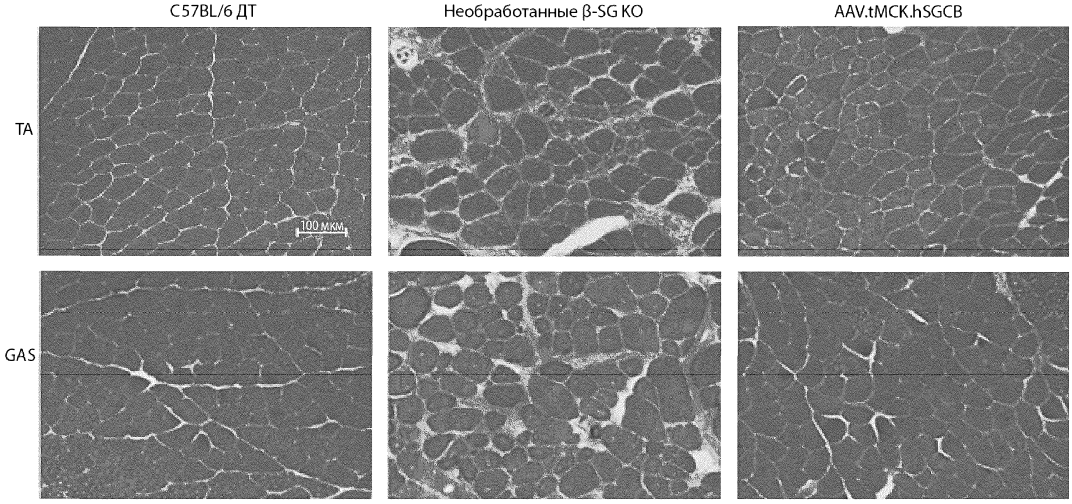
Фиг. 5A



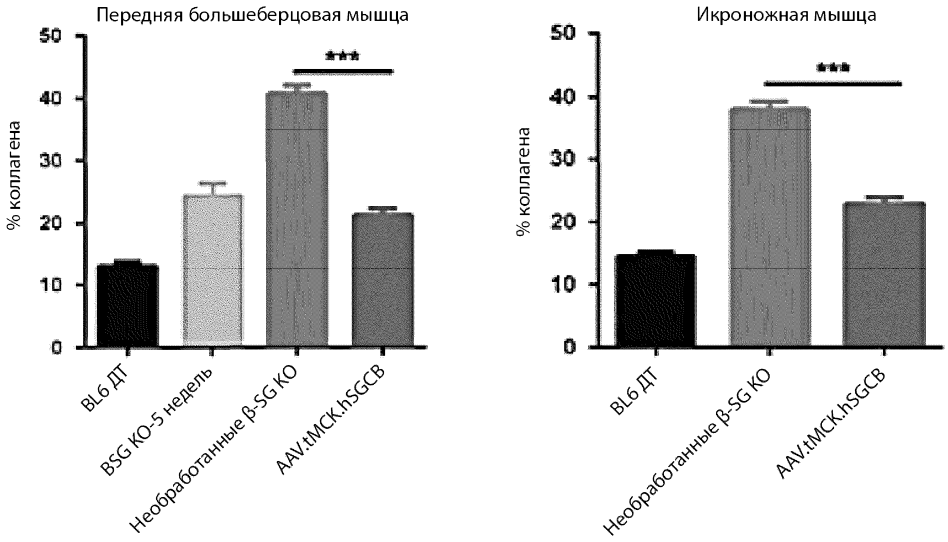
Фиг. 5B



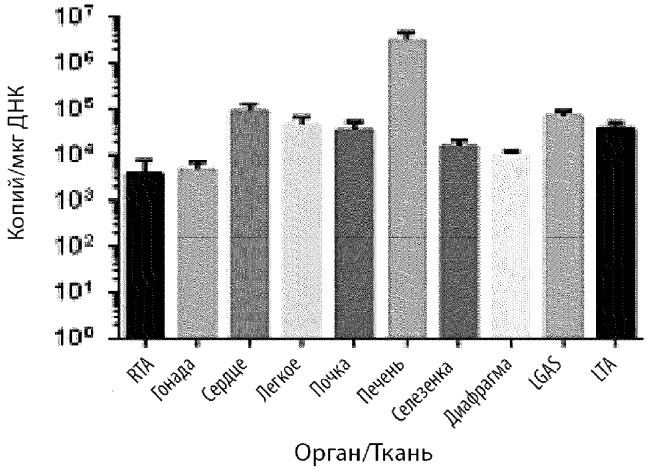
Фиг. 5C



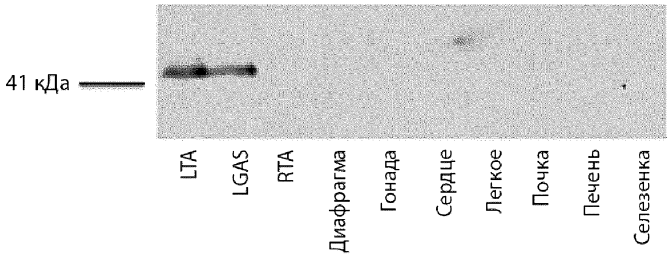
Фиг. 6A



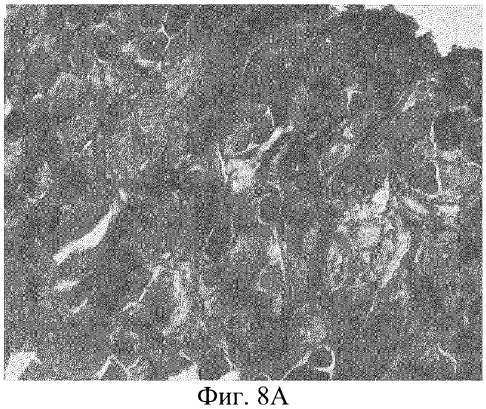
Фиг. 6В



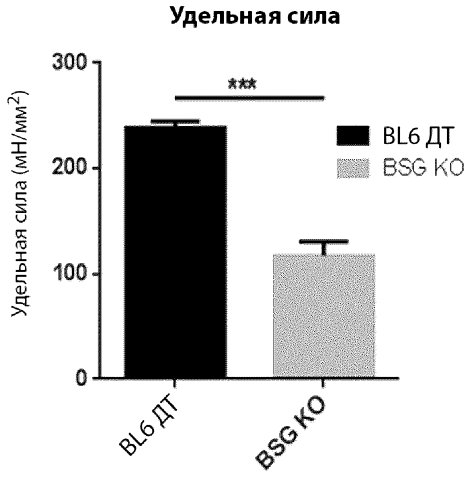
Фиг. 7А



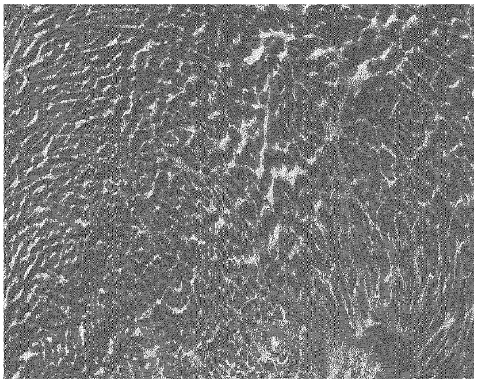
Фиг. 7В



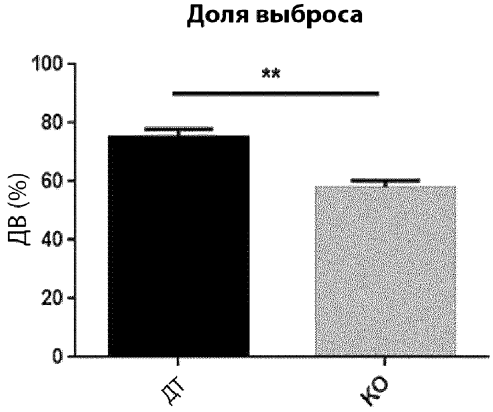
Фиг. 8А



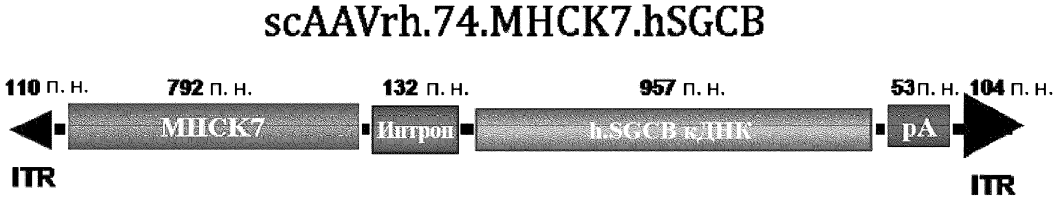
Фиг. 8B



Фиг. 8C

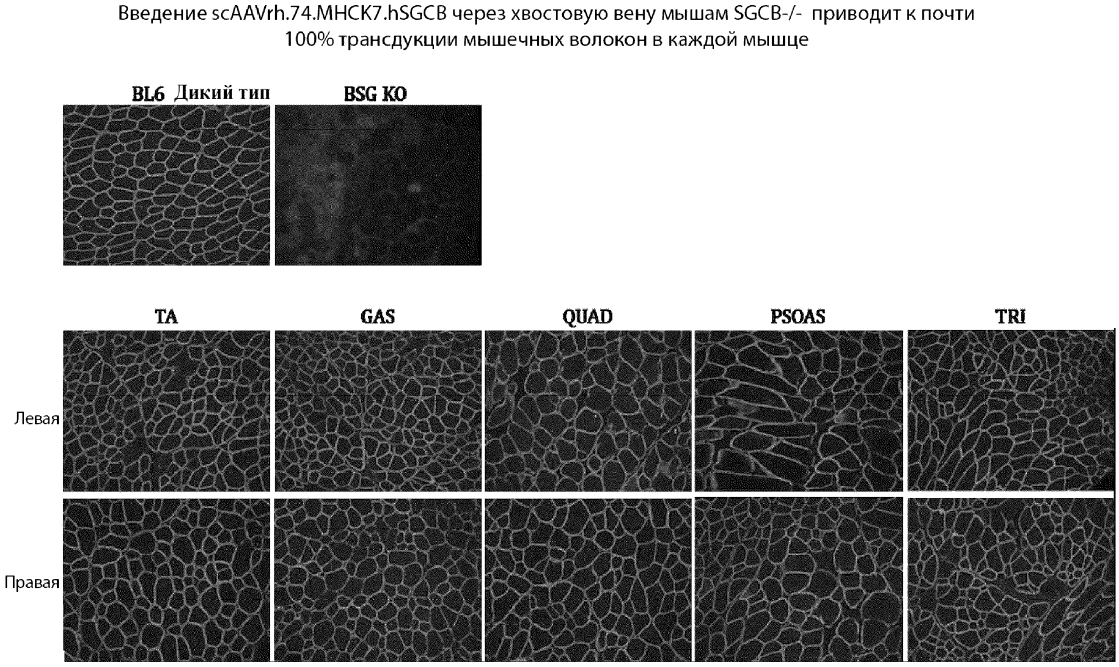


Фиг. 8D

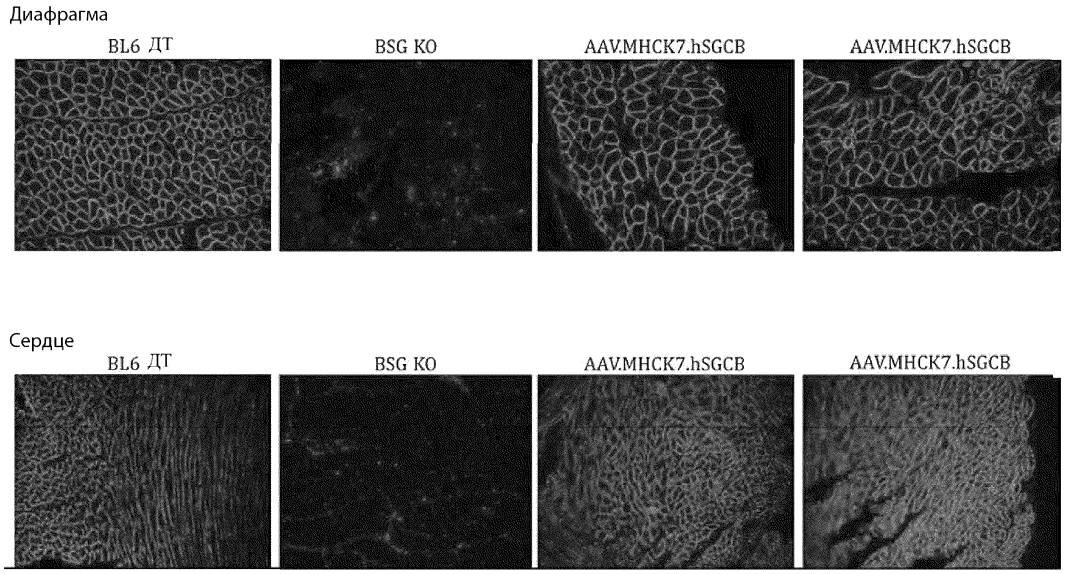


кассета scAAV.MHCK7.hSGCB

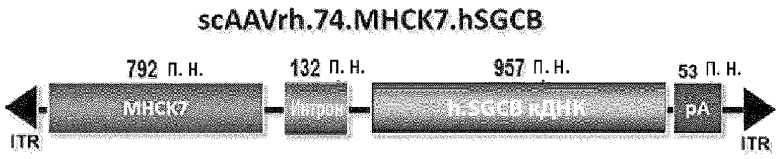
Фиг. 9



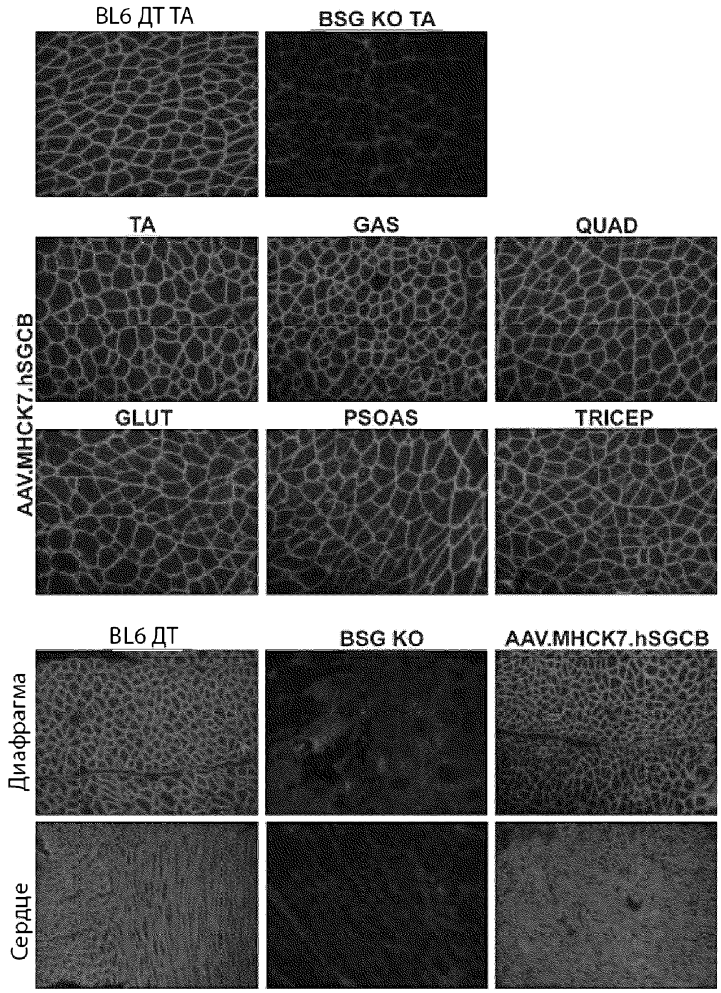
Фиг. 10



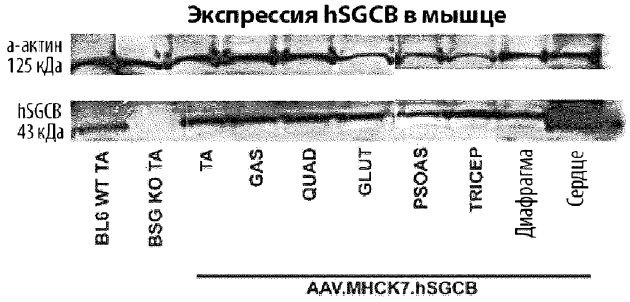
Фиг. 11



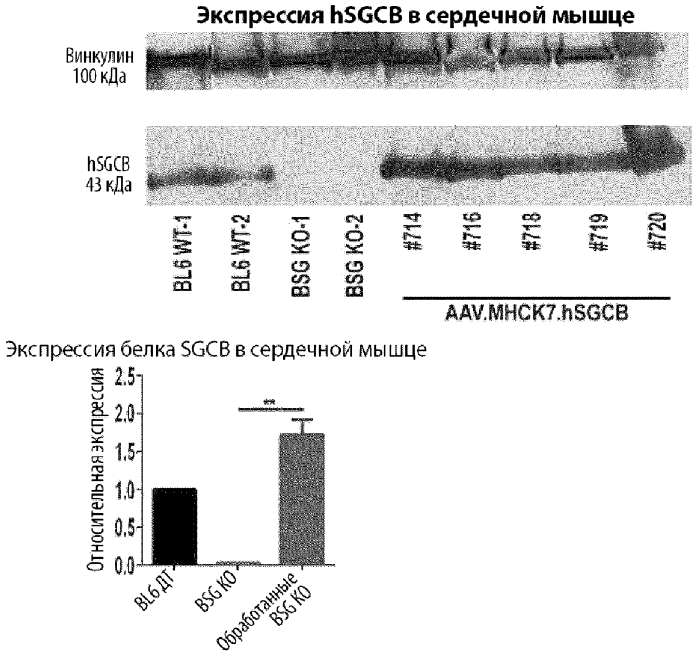
Фиг. 12A



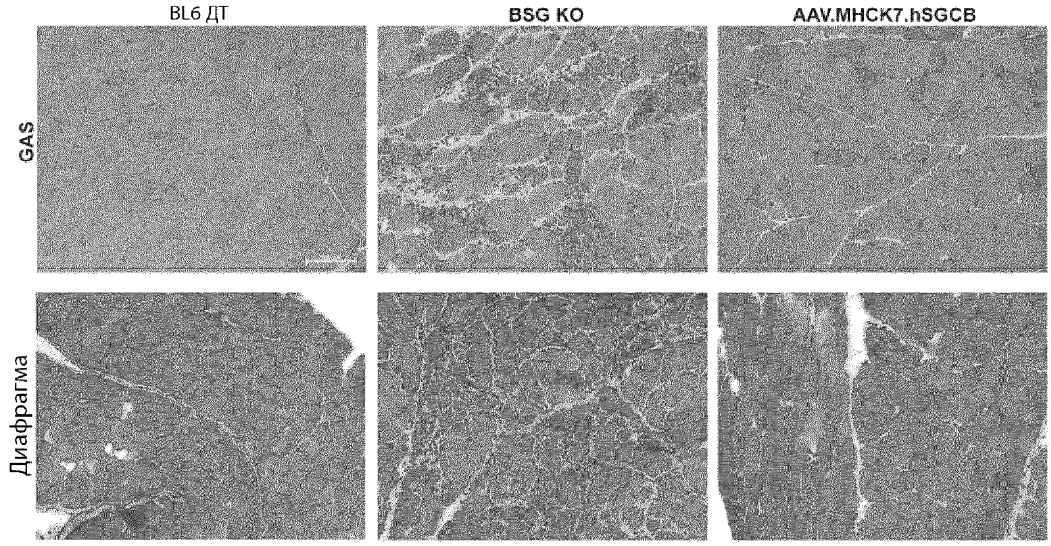
Фиг. 12B



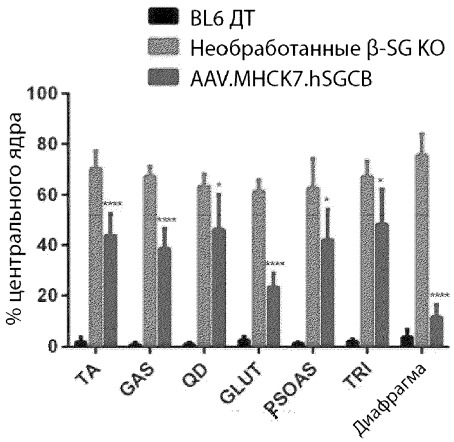
Фиг. 12C



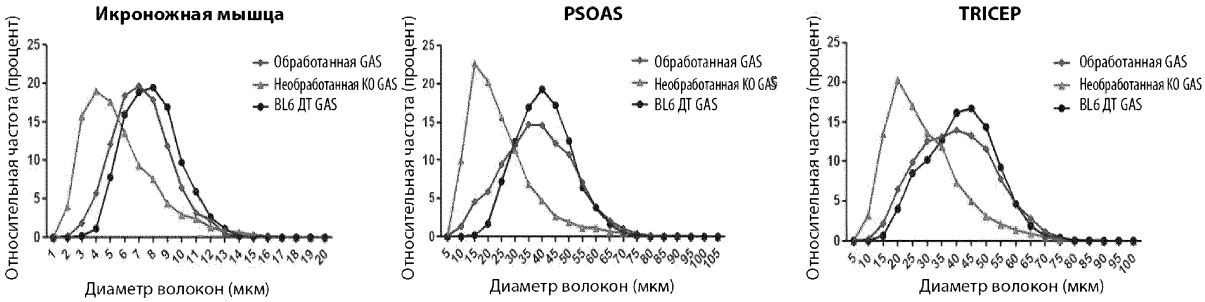
Фиг. 12D



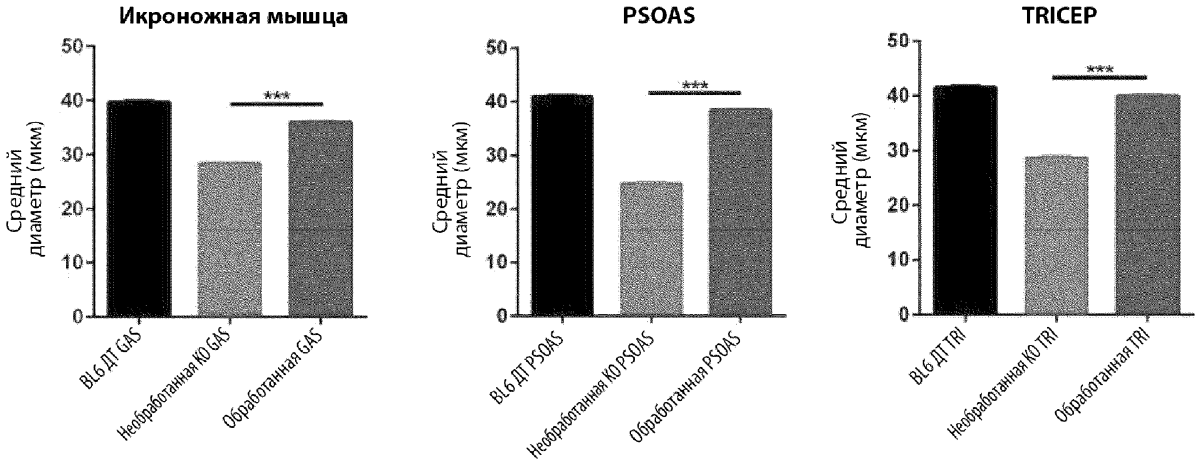
Фиг. 13A



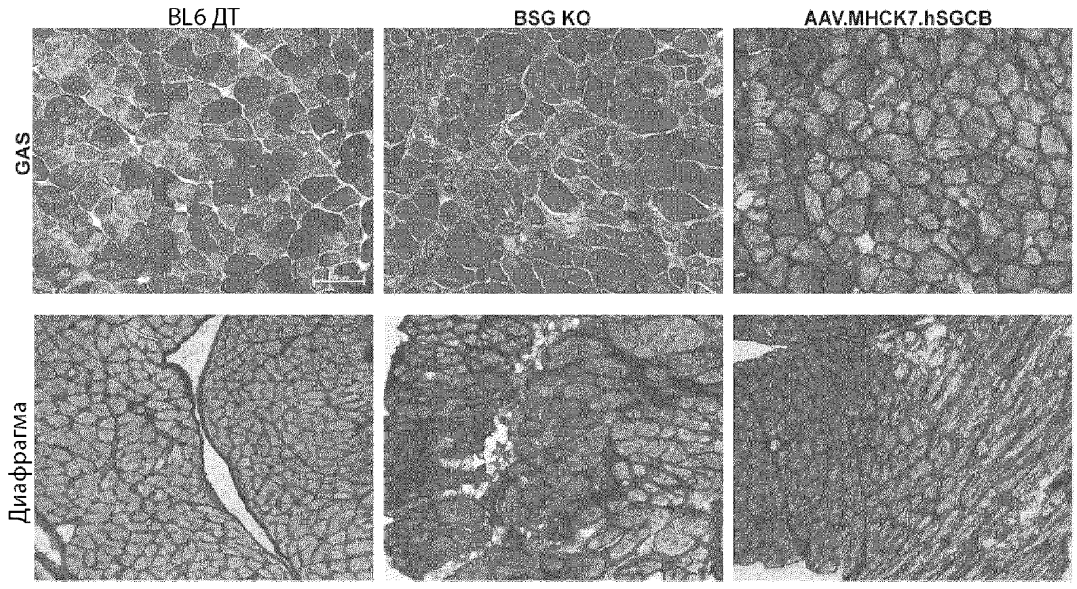
Фиг. 13B



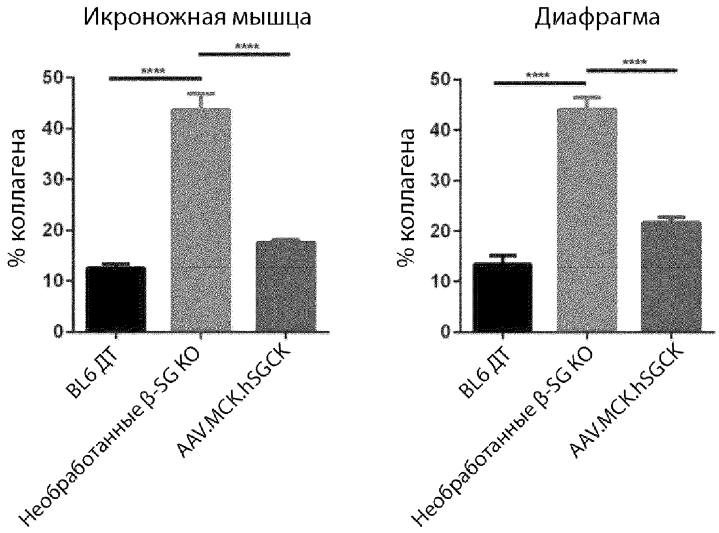
Фиг. 13C



Фиг. 13D

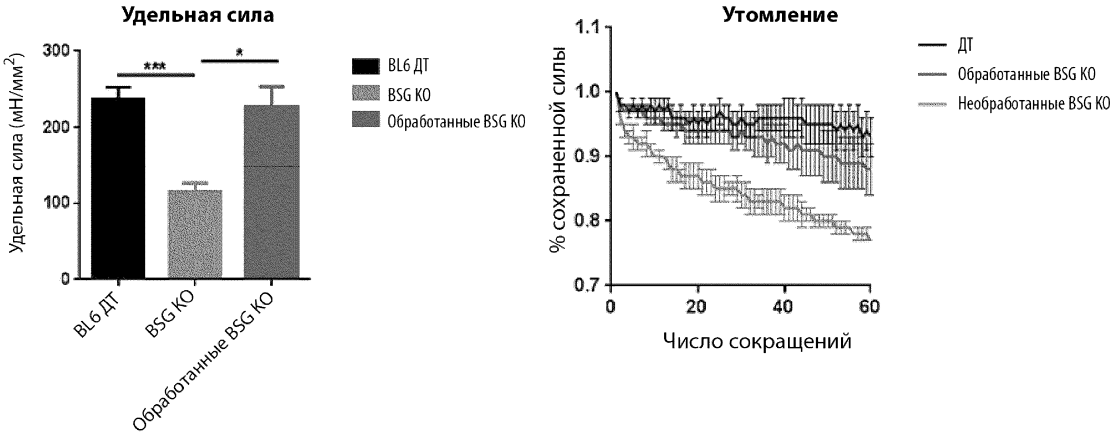


Фиг. 14A



Фиг. 14B

MHCK7.hSGCB 6 месяцев BB1e12гв

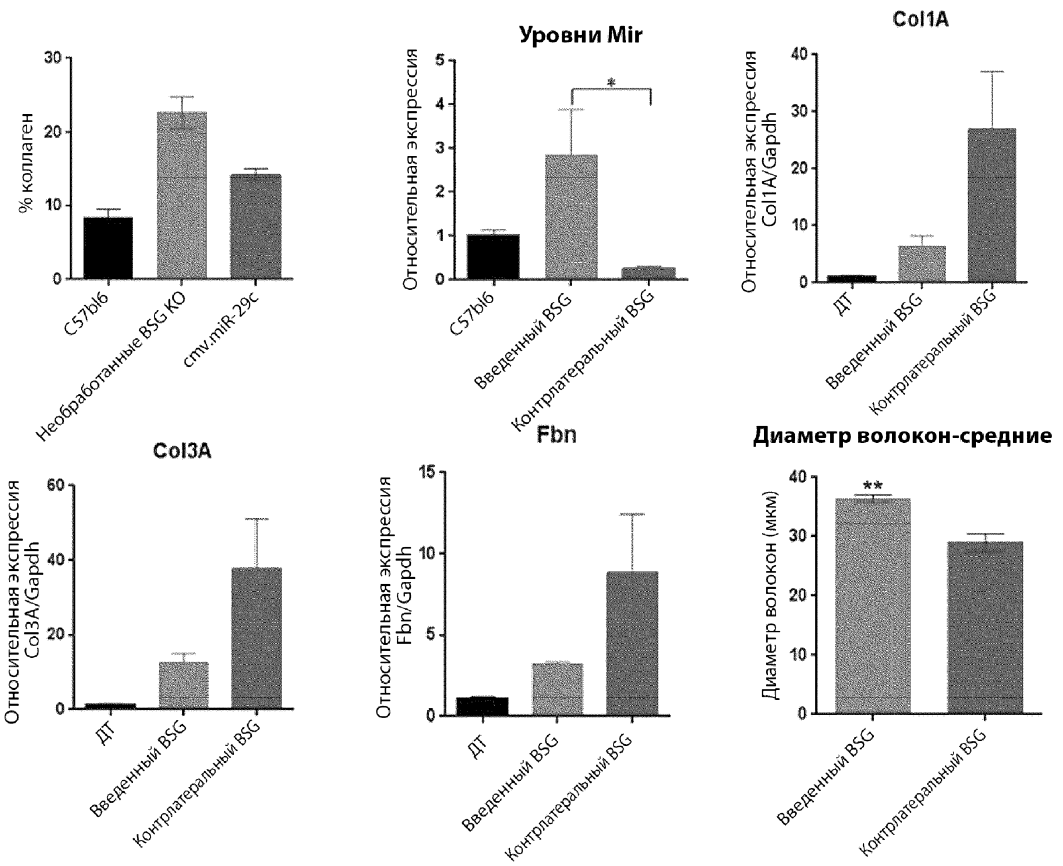


Фиг. 15

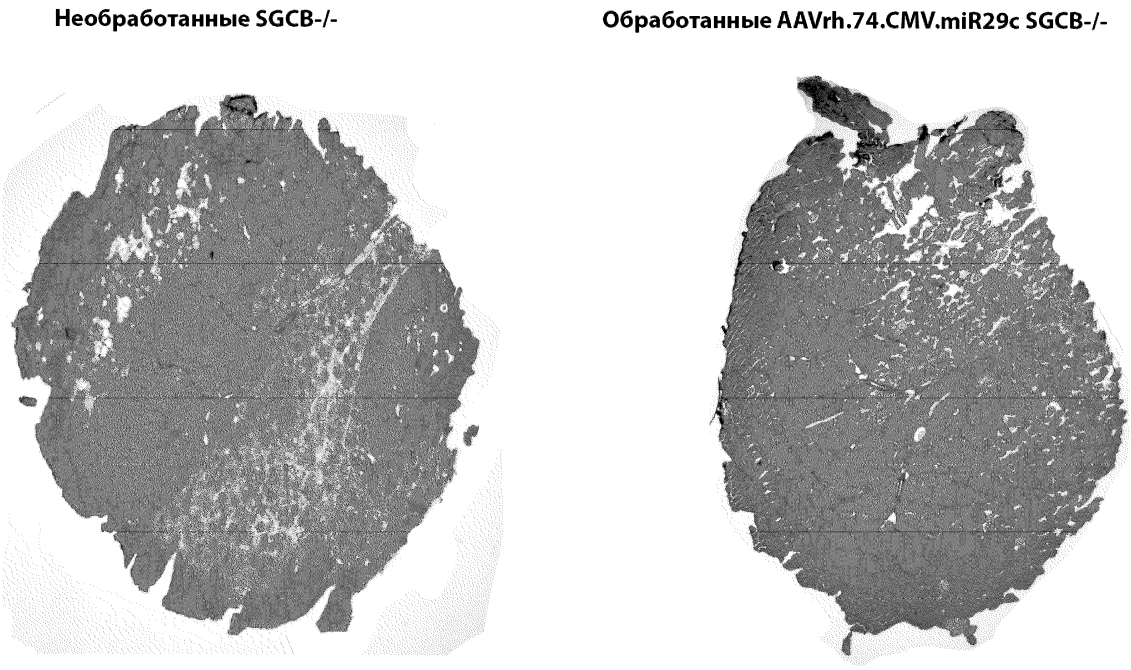
SEQ ID: 9: miR29C в основе miR-30

GGCCGGCC*tgtttgaatgaggcttcagtactttacagaat*CGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTAC
TTCTTCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCAACC
GATTTCAAATGGTGCTAGAGTGAAGCCACAGATGTCTAGCACCATTTGAAATCGGTTATGCCTA
CTGCCTCGGAATTCAAGGGGCTACTTTAGGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT
GCTATCTCTTTGATACATTGGCCGGCC

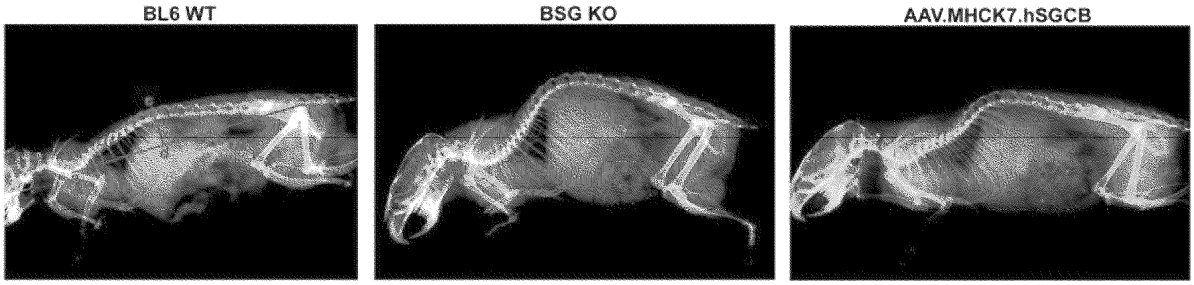
Фиг. 16


% коллаген
C57bl6
Необработанные BSG KO
cmv.miR-29c
Уровни Mir
Относительная экспрессия
C57bl6
Введенный BSG
Контрлатеральный BSG
Col1A
Относительная экспрессия Col1A/Gapdh
ДТ
Введенный BSG
Контрлатеральный BSG
Col3A
Относительная экспрессия Col3A/Gapdh
ДТ
Введенный BSG
Контрлатеральный BSG
Fbn
Относительная экспрессия Fbn/Gapdh
ДТ
Введенный BSG
Контрлатеральный BSG
Диаметр волокон-средние
Диаметр волокон (мкм)
Введенный BSG
Контрлатеральный BSG

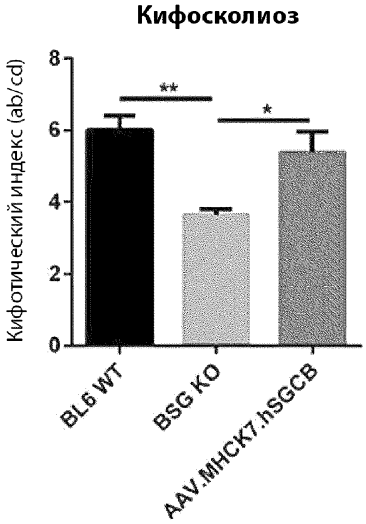
Фиг. 17


Необработанные SGCB-/-
Обработанные AAVrh.74.CMV.miR29c SGCB-/-

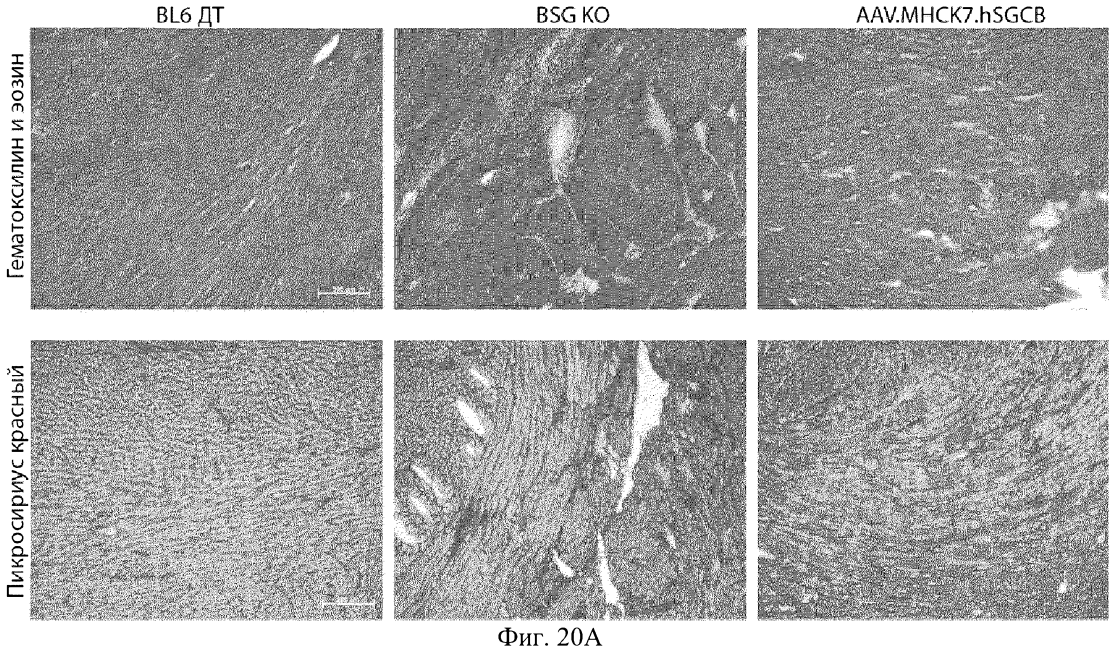
Фиг. 18



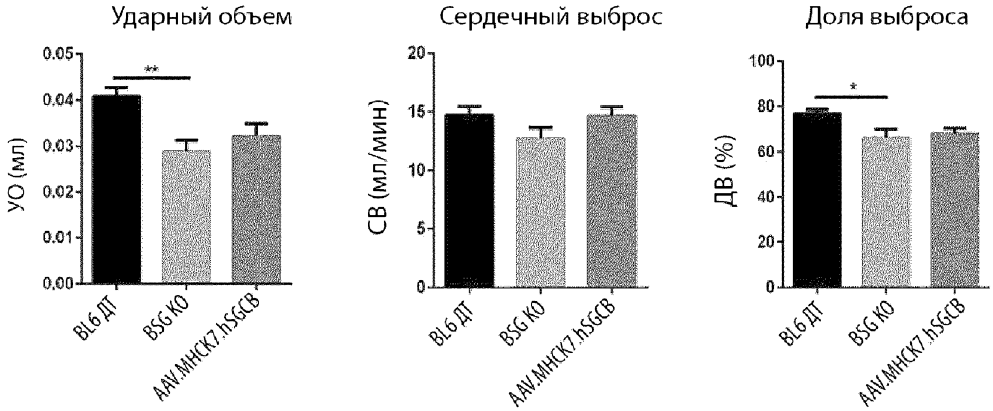
Фиг. 19A



Фиг. 19B

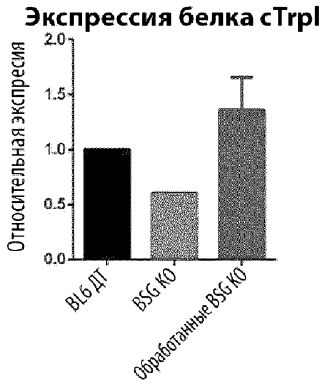


Фиг. 20A

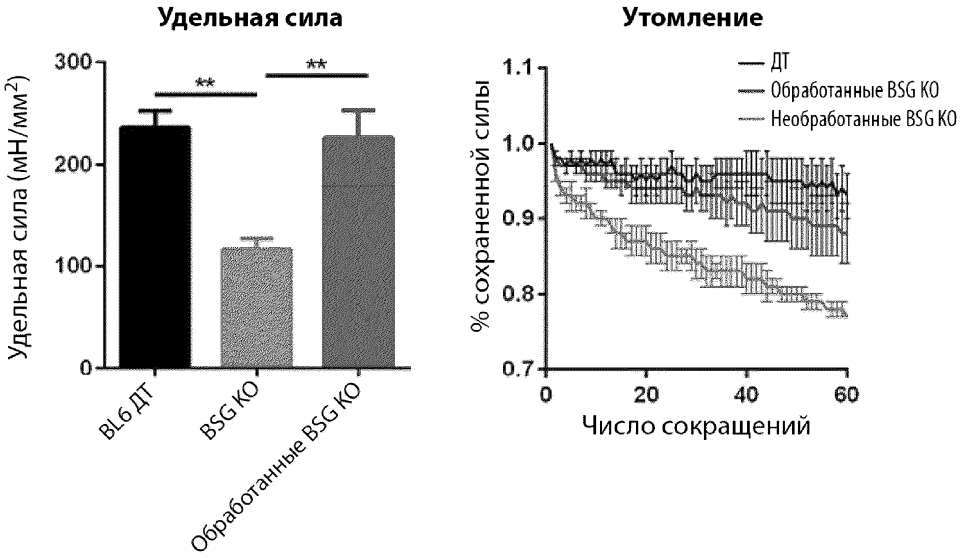


Фиг. 20B

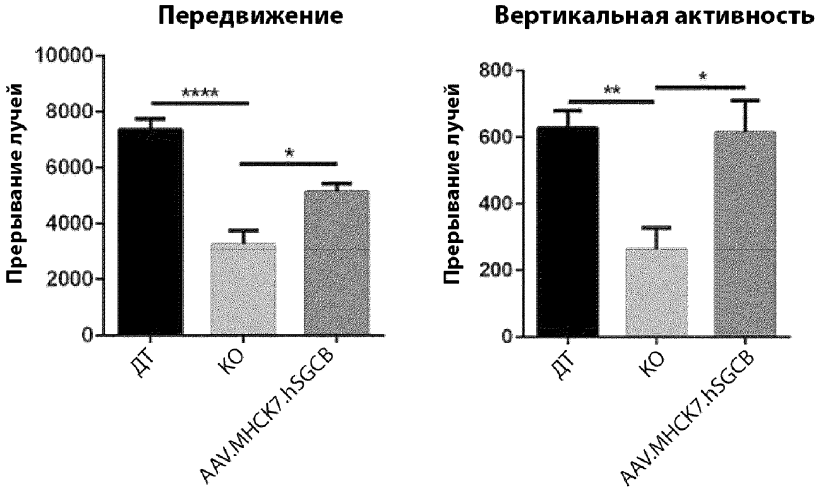
Фиг. 20C



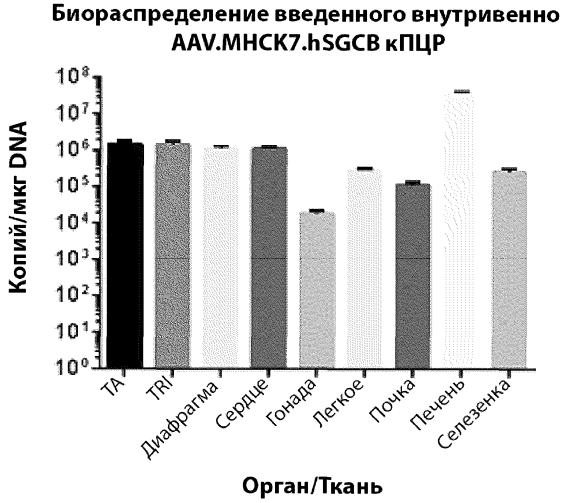
Фиг. 20D



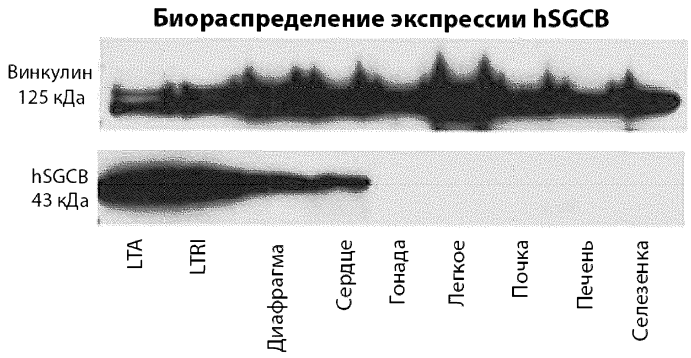
Фиг. 21A



Фиг. 21B



Фиг. 22A


Биораспределение экспрессии hSGCB
Винкулин
125 кДа
hSGCB
43 кДа
LTA
LTRI
Диафрагма
Сердце
Гонада
Легкое
Почка
Печень
Селезенка

Фиг. 22B